

REC'D 03 MAR 2003

10 / 500207

WIPO

PCT

PCT/JP02/13650

28 JUN 2004

26.12.02

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年12月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-400677

[ST.10/C]:

[JP2001-400677]

出 願 人

Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

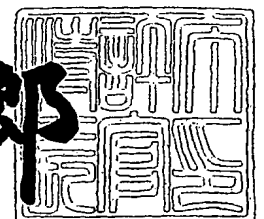
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3006018

【書類名】 特許願

【整理番号】 H13-2344S3

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/00 ABG  
A61P 19/02  
C12P 21/08

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式  
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 田村 忠史

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式  
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 内井 雅子

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式  
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 三木 一郎

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町祇園 3 - 1 - 3 D - 3 0 3

【氏名】 田中 亨

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 関節炎の治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節炎の予防薬または治療薬。

【請求項2】 FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1記載の医薬。

【請求項3】 モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項2記載の医薬。

【請求項4】 ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM B P-5451) である請求項3記載の医薬。

【請求項5】 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域 (CDR) 移植抗体から選ばれる抗体である請求項3記載の医薬。

【請求項6】 ヒト型キメラ抗体が、抗体重鎖可変領域 (VH) が、配列番号2で示されるアミノ酸配列、および/または抗体軽鎖可変領域 (VL) が、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項5記載の医薬。

【請求項7】 ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM B P-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である請求項6記載の医薬。

【請求項8】 ヒト型CDR移植抗体が、VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号5、6および7で示されるアミノ酸配列、および/またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項5記載の医薬。

【請求項9】 ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列、および/またはVLが配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項8記載の医薬。

【請求項10】 ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、8

7番目のA r gおよび95番目のT y rから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および／またはV Lが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のI l e、3番目のV a l、14番目のT h r、15番目のP r o、50番目のG l n、51番目のL e uおよび92番目のT y rから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体である、請求項8記載の医薬。

【請求項11】 抗体断片が、F a b、F a b'、F (a b')<sub>2</sub>、1本鎖抗体(s c F v)、2量体化可変領域(V領域)断片(D i a b o d y)、ジスルフィド安定化V領域断片(d s F v)およびC D Rを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項3記載の医薬。

【請求項12】 F G F-8に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬。

【請求項13】 F G F-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の診断薬。

【請求項14】 モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項13記載の診断薬。

【請求項15】 ハイブリドーマが、ハイブリドーマK M 1 3 3 4 (F E R M B P-5 4 5 1)である請求項14記載の診断薬。

【請求項16】 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型C D R移植抗体から選ばれる抗体である請求項14記載の診断薬。

【請求項17】 ヒト型キメラ抗体が、V Hが配列番号2で示されるアミノ酸配列、および／またはV Lが、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項16記載の診断薬。

【請求項18】 ヒト型キメラ抗体が形質転換体K M 3 0 3 4 (F E R M B P-7 8 3 6)が生産するヒト型キメラ抗体である請求項17記載の診断薬。

【請求項19】 ヒト型C D R移植抗体が、V HのC D R 1、C D R 2およびC D R 3が、それぞれ配列番号5、6および7で示されるアミノ酸配列、および／

またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項16記載の診断薬。

【請求項20】 ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列、および／またはVLが配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項19記載の診断薬。

【請求項21】 ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および／またはVLが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体である、請求項19記載の診断薬。

【請求項22】 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項14記載の診断薬。

【請求項23】 FGF-8に特異的に結合する抗体を用いて試料中のFGF-8を検出および／または定量することを特徴とする関節炎の判定方法。

【請求項24】 FGF-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項23記載の判定方法。

【請求項25】 モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項24記載の判定方法。

【請求項26】 ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334(FERM BP-5451)である請求項25記載の判定方法。

【請求項27】 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体から選ばれる抗体である請求項25記載の判定方法。

【請求項28】 ヒト型キメラ抗体が、VHが配列番号2で示されるアミノ酸配列、および／またはVLが、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項27記載の判定方法。

【請求項29】 ヒト型キメラ抗体が、形質転換体KM3034 (FERM B P-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である請求項28記載の判定方法。

【請求項30】 ヒト型CDR移植抗体が、VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号5、6および7で示されるアミノ酸配列、および／またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項27記載の判定方法。

【請求項31】 ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列、および／またはVLが配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む抗体である請求項30記載の判定方法。

【請求項32】 ヒト型CDR移植抗体が、VHが、配列番号15で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および／またはVLが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型CDR移植抗体である、請求項30記載の判定方法。

【請求項33】 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項25記載の判定方法。

【請求項 3 4】 F G F - 8 に特異的に結合し、F G F - 8 の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節破壊抑制剤。

【請求項 3 5】 F G F - 8 に特異的に結合し、F G F - 8 の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する軟骨保護剤。

【請求項 3 6】 F G F - 8 に特異的に結合し、F G F - 8 の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する滑膜増殖抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明が属する技術分野】

本発明は、抗 F G F - 8 抗体を有効成分として含有する、関節炎の予防薬または治療薬、関節破壊抑制剤、軟骨保護剤、滑膜増殖抑制剤および関節炎の診断薬、ならびに該抗体を用いる関節炎の判定方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

高齢者社会において関節症状を訴える人は確実に増加している。関節疾患の代表的な変形性関節症、あるいは関節リウマチといった疾患の早期診断やスクリーニング、あるいは患者の予後判定を的確に行うことは大変重要であり、その治療が多くの高齢者の生活の質を高めることになるが、未だに十分な診断や治療方法が確立していない。

【0 0 0 3】

関節軟骨は、関節の可動面を覆う少数の軟骨細胞と豊富な細胞外マトリックスに富んだ組織で、血管や神経は分布しておらず、主として関節内面を覆う滑膜から産生される滑液から栄養補給を受けている。また、無血管であるだけでなく、血管網に富む周囲組織からの血管の侵入に対して強い抵抗性を示す。軟骨細胞は、細胞外マトリックス合成、分解の両面を複雑に制御し、細胞外マトリックスの恒常性の維持に中心的役割を担っている。サイトカイン、成長因子などの化学的因子や荷重負荷などの力学的因子は軟骨細胞に作用し、細胞外マトリックス合成、分解の両者のバランスを変えることにより、細胞外マトリックス代謝に影響する。



## 【0004】

変形性関節症は、加齢や機械的ストレスが原因となって、関節軟骨表面の崩壊と、これに伴う関節辺縁の新たな軟骨の増殖、関節の変形、適合性の破壊をきたし、さらに関節滑膜の炎症へと進行する。変形性関節炎は、関節の軟骨の遅行変性で、しばしば痛みと機能喪失とを特徴とする単関節炎疾患である (Manek M. J. and Lane N. E., Am. Fam. Physician, 61, 1795-1804, 2000)

関節リウマチでは、免疫異常や感染症が原因となって、滑膜に炎症性細胞が浸潤し、さらに、血管新生に伴って滑膜線維芽細胞の増殖が亢進して、パンヌスと呼ばれる炎症性滑膜肉芽組織が形成される。パンヌスが形成されると、骨や軟骨の破壊が進み、関節に不可逆的な障害がもたらされる。骨や軟骨が破壊される過程では、多量に存在するコラーゲンやプロテオグリカンなどの種々の細胞外マトリックスが分解される。

## 【0005】

変形性関節症あるいは関節リウマチなどの関節症において、滑膜炎および細胞外マトリックスの破壊が関節軟骨の機能喪失へつながってゆく。

変形性関節症と関節リウマチは、病因論的に全く異なる疾患であるが、関節軟骨破壊機構において多くの共通点を有する。関節滑液および滑膜・軟骨などの関節局所で多種類のマトリックスメタロプロテアーゼが産生・分泌され、関節局所にマトリックスメタロプロテアーゼが過剰に検出される。マトリックスメタロプロテアーゼは多種類の細胞外マトリックスを分解するため、このことが関節破壊の一因となっている。これらの産生は、炎症滑膜、マクロファージ、好中球のみならず軟骨細胞からも産生されるが、その産生は同じ関節局所において産生分泌される種々のサイトカイン、活性酸素、一酸化窒素、プロスタグランジン、成長因子等により調節されている。これらは滑膜細胞、軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼの産生を誘導して、細胞外マトリックスの分解を促進することも報告されている。

## 【0006】

これらの報告から、変形性関節症や関節リウマチのほか、自己抗体の出現と免疫複合体の組織沈着による炎症性組織傷害が認められる原因不明の疾患で、関節

症状が高率に出現する全身性エリテマトーデス、強直性関節炎、乾癬症患者に合併する滑膜増殖を伴い骨破壊にまで至る乾癬性関節炎、椎間板の細胞外マトリックスの破壊が認められる椎間板疾患、急性結晶性滑膜炎（痛風、偽痛風）といった関節炎疾患（広畑和志ら編 リウマチ学 同文書院 1989年）において、滑膜の増殖や軟骨破壊を抑制することにより治療することが可能と考えられる。

#### 【0007】

従来、関節リウマチの薬物療法は、主に関節の疼痛および炎症を軽減するために、種々の非ステロイド性抗炎症薬、プレドニゾン等のステロイド剤やメトトレキサートをはじめとする抗リウマチ薬が使われている（治療, 78, 3553-3558, 南山堂, 1996）。変形性関節症においては、疼痛および炎症の除去のために、種々の非ステロイド性抗炎症薬や鎮痛剤や、関節注入剤ヒアルロン酸製剤等の投与が行われてきた。軟骨破壊を抑制するヒアルロン酸は軟骨保護剤として使われている（Creamer P., J. Rheum., 20, 1461-1464, 1993, Arthritis Rheum., 43, 1905-1915, 2000）。また、理学療法や、骨切り術、人工関節置換術等の手術療法も行われている。全身性エリテマトーデスでは非ステロイド性抗炎症薬やプレドニゾン等のステロイド剤、強直性関節炎には非ステロイド性抗炎症薬や抗リウマチ薬であるスルファサラジン、乾癬症患者に合併する滑膜増殖を伴い骨破壊にまで至る乾癬性関節炎では非ステロイド性抗炎症薬、抗リウマチ薬やステロイドの関節内注入、椎間板の細胞外マトリックスの破壊が認められる椎間板疾患では非ステロイド性抗炎症薬や鎮痛薬、急性結晶性滑膜炎では非ステロイド性抗炎症薬やコルヒチン等が使われている（広畑和志ら編 リウマチ学 同文書院 1989年）が、このような薬物療法は対症療法で、関節破壊を十分に抑制することは困難であった。

#### 【0008】

現在、関節リウマチの治療では、関節の破壊を少しでも予防しようとする積極的な治療法の選択が受け入れられつつあり、なるべく早い段階で関節リウマチと診断して、メトトレキサートをはじめとする抗リウマチ薬を、いかに適切に選択していくかがポイントとなっているが、十分な診断法はまだない。

生体内に存在する様々な成長因子の一種である線維芽細胞増殖因子（以下、F

GFと略す)は、血管内皮細胞に作用するヘパリン結合性増殖因子として知られている。また、FGFファミリーには19種類以上あり、FGF-2 (basic FGF) や FGF-1 (acidic FGF) 等が古くから知られている。FGF受容体は現在までに7種類見出されており、チロシンキナーゼを細胞内領域にコードしている。

#### 【0009】

FGF-8は、アンドロジェン誘導増殖因子(AIGF)として、性ホルモン依存的増殖を示すマウス乳癌細胞株SC-3 (Nakamura N. et al., J. Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987)の培養上清中より単離された因子で、アンドロジェン刺激により誘導産生され、オートクライン的にSC-3細胞を増殖させる増殖因子である(Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992)。FGF-8は、前立腺癌の細胞や繊維芽細胞の増殖を促進させることが報告されている(Tanaka A. et al., FEBS Lett., 363, 226-230, 1995)。FGF-8はFGFレセプター-2 IIIc、FGFレセプター-3 IIIc、FGFレセプター-4の3種のレセプターに結合することが報告されている(Ornitz D. M. et al., J. Biol. Chem., 271, 15292-15297, 1996)。また、FGFの作用にはシンデカンなどの膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの結合が不可欠である。ヘパラン硫酸との結合はFGFを安定的に局所に蓄積するためにも必要である。炎症などの組織改変の状況ではヘパラン硫酸が分解されることにより、細胞外マトリックスからFGFが遊離して、その活性を発揮すると考えられている。軟骨中にはFGF-2のような強い血管新生因子が含有されている(Satoh H. et al., J. Biol. Chem., 273, 12307-12315, 1998)。また関節炎では滑膜細胞、軟骨細胞および侵入した炎症細胞が著しく高レベルのFGF-1やFGF-2を合成し(Sano H. et al., J. Cell Biol., 110, 1417-1426, 1990、Remmers E. F., Growth factors, 2, 179-188, 1990)、リウマチ患者の関節液中のFGF-2濃度は、関節症状と相関する(Manabe N. et al., Rheumatology, 38, 714-720, 1999)。FGF-2は変形性関節症における骨棘形成に関与している(Uchino M. et al., Clin. Orthop., 377, 119-125, 2000)。これらの報告はFGF-1やFGF-2が関節炎に関与することを示している。

## 【0010】

FGF-8ノックアウトマウスを用いた報告では、FGF-8が関節の発生段階に発現している (Haraguchi R. et al., Development, 127, 2471-2479, 2000 ; Lewandoski M. et al., Nat. Genet., 26, 460-463, 2000) とされるが、FGF-8の関節炎への関与は知られていない。

## 【0011】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、関節炎の予防薬または治療薬、関節破壊抑制剤、軟骨保護剤、滑膜増殖抑制剤および関節炎の診断薬、ならびに関節炎の判定方法を提供することにある。

## 【0012】

## 【発明を解決するための手段】

本発明は以下の(1)～(36)に関する。

- (1) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節炎の予防薬または治療薬。
- (2) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする(1)記載の医薬。
- (3) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である(2)記載の医薬。
- (4) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451)である(3)記載の医薬。
- (5) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域(CDR)移植抗体から選ばれる抗体である(3)記載の医薬。

## 【0013】

- (6) ヒト型キメラ抗体が、抗体重鎖可変領域(VH)が、配列番号2で示されるアミノ酸配列、および/または抗体軽鎖可変領域(VL)が、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む抗体である(5)記載の医薬。
- (7) ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM BP-7836)が生産するヒト型キメラ抗体である(6)記載の医薬。

(8) ヒト型CDR移植抗体が、VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号5、6および7で示されるアミノ酸配列、および／またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む抗体である(5)記載の医薬。

(9) ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列、および／またはVLが配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む抗体である(8)記載の医薬。

(10) ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および／またはVLが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体である、(8)記載の医薬。

#### 【0014】

(11) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1本鎖抗体(scFv)、2量体化可変領域(V領域)断片(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(3)記載の医薬。

(12) FGF-8に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬。

(13) FGF-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする(12)記載の診断薬。

(14) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である(13)記載の診断薬。

(15) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334(FERM B P-

5451)である(14)記載の診断薬。

【0015】

(16) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体から選ばれる抗体である(14)記載の診断薬。

(17) ヒト型キメラ抗体が、VHが配列番号2で示されるアミノ酸配列、および/またはVLが、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む抗体である(16)記載の診断薬。

(18) ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034(FERM BP-7836)が生産するヒト型キメラ抗体である(17)記載の診断薬。

(19) ヒト型CDR移植抗体が、VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号5、6および7で示されるアミノ酸配列、および/またはVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号8、9および10で示されるアミノ酸配列を含む抗体である(16)記載の診断薬。

(20) ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列、および/またはVLが配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む抗体である(19)記載の診断薬。

【0016】

(21) ヒト型CDR移植抗体が、VHが配列番号15で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および/またはVLが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体である、(19)記載の診断薬。

(22) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断

片 (d s F v) および C D R を含むペプチドから選ばれる抗体断片である (14) 記載の診断薬。

(23) F G F - 8 に特異的に結合する抗体を用いて試料中の F G F - 8 を検出および／または定量することを特徴とする関節炎の判定方法。

(24) F G F - 8 に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする (23) 記載の判定方法。

(25) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である (24) 記載の判定方法。

#### 【0017】

(26) ハイブリドーマが、ハイブリドーマ K M 1 3 3 4 (F E R M B P - 5 4 5 1) である (25) 記載の判定方法。

(27) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 C D R 移植抗体から選ばれる抗体である (25) 記載の判定方法。

(28) ヒト型キメラ抗体が、V H が配列番号 2 で示されるアミノ酸配列、および／または V L が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む抗体である (27) 記載の判定方法。

(29) ヒト型キメラ抗体が、形質転換体 K M 3 0 3 4 (F E R M B P - 7 8 3 6) が生産するヒト型キメラ抗体である (28) 記載の判定方法。

(30) ヒト型 C D R 移植抗体が、V H の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7 で示されるアミノ酸配列、および／または V L の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で示されるアミノ酸配列を含む抗体である (27) 記載の判定方法。

#### 【0018】

(31) ヒト型 C D R 移植抗体が、V H が配列番号 15 で示されるアミノ酸配列、および／または V L が配列番号 16 で示されるアミノ酸配列を含む抗体である (30) 記載の判定方法。

(32) ヒト型 C D R 移植抗体が、V H が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列のうち、12番目の L y s、13番目の L y s、40番目の A l a、41番目の P r o、48番目の M e t、68番目の V a l、70番目の I l e、74番

目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および/またはVLが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型CDR移植抗体である、(30) 記載の判定方法。

(33) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(25) 記載の判定方法。

(34) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節破壊抑制剤。

(35) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する軟骨保護剤。

(36) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する滑膜増殖抑制剤。

#### 【0019】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬に用いられる抗体は、FGF-8に特異的に結合し、かつFGF-8の活性を阻害する抗体(以下、抗FGF-8中和抗体とも称する)であればいかなるものでもよく、例えば、FGF-8に対して中和活性を有する抗体および該抗体断片などがあげられる。

#### 【0020】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬に用いられる抗FGF-8中和抗体は、FGF-8に特異的に結合する抗体(以下、FGF-8抗体とも称する)の中から、FGF-8の活性を阻害する能力を有する抗体を選択することにより得ることができる。FGF-8の活性としては、FGF-8が有する生物活性であれば



いかなるものであってもよいが、具体的には、マウス乳癌細胞株SC-3 (Nakamura N. et al., J Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987)、マウス線維芽細胞株NIH3T3 (ATCC番号: CRL-1658)、もしくはヒト前立腺癌細胞株LNCaP (ATCC番号: CRL-1740)の増殖を促進する活性、滑膜細胞の増殖を促進する活性、軟骨細胞の細胞外マトリックスの分解を促進する活性をあげることができる。

#### 【0021】

抗FGF-8抗体は、公知の手段 (Harlow E. and Lane D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、以下、アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す) を用いて製造することができる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される抗FGF-8中和抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。

#### 【0022】

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、ヒト化抗体およびこれらの抗体の抗体断片をあげることができる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される、ハイブリドーマにより生産される抗FGF-8中和モノクローナル抗体は、具体的には以下に述べる方法によって製造することができる。

#### 【0023】

すなわち、FGF-8蛋白質を抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水よりFGF-8に特異的に結合する抗体を分離、精製する。得られた抗体の中から、FGF-8の活性を阻害する抗体を選択する。このような抗FGF-8中和モノクローナル抗体として、特開平9-271391に記載されているマウスIgG1サブクラスに属するハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451)

が生産するモノクローナル抗体KM1334があげられる。

#### 【0024】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト化抗体としては、上記の抗FGF-8中和モノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものがあげられる。該抗体においては、抗原性が低く、血中半減期の延長されたものが、予防薬または治療薬として好ましい。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域 (complementary determining region; 以下、CDRと略記する。) 移植抗体を包含する。

#### 【0025】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域 (以下、可変領域をV領域、重鎖可変領域をVHと称す) および軽鎖V領域 (以下、VLと称す) とヒト抗体の重鎖定常領域 (以下、定常領域をC領域、重鎖定常領域をCHと称す) およびヒト抗体の軽鎖C領域 (以下、CLと称す) とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

#### 【0026】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト型キメラ抗体は、抗FGF-8中和モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

#### 【0027】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン (hIg) に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、hIgGクラスに属する $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

## 【0028】

FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害するヒト型キメラ抗体（以下、抗FGF-8中和キメラ抗体とも称する）としては、配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなるVHのCDR1、CDR2、CDR3および／または配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列からなるVLのCDR1、CDR2、CDR3を含むヒト型キメラ抗体、好ましくはVHが配列番号2で示されるアミノ酸配列および／またはVLが配列番号4で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体があげられる。具体的には、抗体のVHが配列番号2記載のアミノ酸配列、CHがヒト $\gamma$ 1サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体のVLが配列番号4記載のアミノ酸配列、CLがヒト $\kappa$ クラスのアミノ酸配列からなるヒト型キメラ抗体KM3034があげられる。

## 【0029】

ヒト型キメラ抗体KM3034を生産する形質転換体KM3034は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に平成13年12月26日付けでFERM BP-7836として寄託されている。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト抗体に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト以外の動物の抗体のCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

## 【0030】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

## 【0031】

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよ

いが、h I g Gクラスのものが好適であり、さらにh I g Gクラスに属する $\gamma$  1、 $\gamma$  2、 $\gamma$  3、 $\gamma$  4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、h I gに属すればいずれのものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

### 【0032】

FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害するヒト型CDR移植抗体（以下、抗FGF-8中和CDR移植抗体とも称する）としては、それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHのCDR1、CDR2、CDR3および／またはそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列からなる抗体VLのCDR1、CDR2、CDR3を含むヒト型CDR移植抗体、好ましくは抗体のVHが配列番号15および／またはVLが配列番号16で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、より好ましくはVHが、配列番号15で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列、および／または抗体のVLが、配列番号16で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

### 【0033】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される抗FGF-8中和抗体には抗体断片も含まれる。抗体断片は、FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害する抗体断片であるFab (fragment of antigen bindingの略)、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFvと称す)、2量体化V領域断片(Diabody)、ジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)およびCDRを含むペプチドを含有す

る。

【0034】

F a b は、I g G のヒンジ領域で 2 本の H 鎖を架橋している 2 つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体で構成された、分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

F ( a b' )<sub>2</sub> は、I g G のヒンジ領域の 2 個のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される)、F a b がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0035】

F a b' は、上記 F ( a b' )<sub>2</sub> のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

s c F v は、一本の V H と一本の V L とを適当なペプチドリンカー (以下、P と称す) を用いて連結した、V H - P - V L ないしは V L - P - V H ポリペプチドである。本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される s c F v に含まれる V H および V L は、抗 F G F - 8 中和モノクローナル抗体であればいかなるものでもよい。

【0036】

D i a b o d y は、抗原結合特異性の同じまたは異なる s c F v が 2 量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する 2 価の抗原結合活性または異なる抗原に対するそれぞれ特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

d s F v は、V H および V L 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される d s F v に含まれる V H あるいは V L は、抗 F G F - 8 中和モノクローナル抗

体であればいかなるものでもよい。

#### 【0037】

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるCDRを含むペプチドは、抗FGF-8中和抗体のVHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

以下に、本発明で使用される抗FGF-8中和抗体の具体的な作製方法と活性評価方法、該抗体を含有する関節炎の予防薬または治療薬、抗FGF-8抗体を含有する関節炎の診断薬、抗FGF-8抗体を用いた関節炎の判定方法について説明する。

#### 【0038】

1. 抗FGF-8中和抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）の作製方法

##### （1）抗原の調製

抗FGF-8中和抗体を作製するために必要な抗原としては、FGF-8を産生する細胞あるいはその細胞画分、またはFGF-8蛋白質、該蛋白質の部分断片、該蛋白質のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドなどがあげられる。

#### 【0039】

FGF-8蛋白質および該蛋白質の部分断片は、FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片cDNA（Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 89, 8928-8932, 1992、Tanaka A. et al., FEBS Lett., 363, 226-230, 1996）を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたFGF-8発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、FGF-8蛋白質の部分配列を有するペプチドは、アミノ酸合成機を用いて調製することができる。

#### 【0040】

FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片cDNAは、FGF-8を発現しているSC-3等の細胞から調製したcDNAを鋳型にした、ポリメラー

ゼ連鎖反応 [Polymerase Chain Reaction、以下PCRと記す; Sambrook J. et al., Molecular Cloning 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 (以下、「モレキュラー・クローニング 第3版」と記す)、Ausubel F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-2001 (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと記す)] により調製することができる。

【0041】

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 [ファーミンジェン (Farming) 社製]、High Five [インビトロジェン (Invitrogen) 社製] 等が例示される。

【0042】

FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片cDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片cDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX-2T [アマシャム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences) 社製]、pET17b [ノバジェン (Novagen) 社製] などが例示される。

【0043】

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法で

あれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Cohen S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110-2114, 1972)、プロトプラスト法 (特開昭63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等が用いられる。

#### 【0044】

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 (Becker D. M. and Guarente L., Methods. Enzymol., 194, 182-187, 1991)、スフェロプラスト法 (Hinnen A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933, 1978)、酢酸リチウム法 (Ito H. et al., J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983) 等、いずれの方法も用いられる。

#### 【0045】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 (特開平3-22979; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、pAGE103 (Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987) 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

#### 【0046】

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 (Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413-7417 (1987) 等、いずれの方法も用いられる。



## 【0047】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、O' Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press, 1994等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

## 【0048】

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393（共にファーマンジェン社製）、pBlueBac4.5（インビトロジェン社製）等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)などが用いられる。

## 【0049】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法（Felgner P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417, 1987）等が用いられる。

また、ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five等の昆虫細胞に該組み換えウイルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる（*Bio/Technology*, 6, 47, 1988）。

## 【0050】

遺伝子の発現方法としては、FGF-8蛋白質だけを細胞内に発現させる以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第3版に記載されている方法に準じて行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にFGF-8蛋白質を生成蓄積させ、該培養物からFGF-8蛋白質を採取することにより、FGF-8蛋白質の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

#### 【0051】

形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい（モレキュラー・クローニング 第3版）。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0052】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0053】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーマンジェン社製）、Sf900IISFM（インビトロジェン社製）、ExCell 1400、ExCell 1405〔いずれもJRHバイオサイエンス（JRH Biosciences）社製〕等が用いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0054】

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、FGF-8の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

FGF-8の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

## 【0055】

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

FGF-8蛋白質の全長または部分断片、あるいはこれらの蛋白質の融合蛋白質が細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

## 【0056】

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

## 【0057】

FGF-8のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社、プロテイン・テクノロジーズ（Protein Technologies）社、島津製作所等のペプチド合成機を用いても製造することができる。

## 【0058】

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として動物を免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

## 【0059】

キャリアタンパク質としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (Keyhole limpet hemocyanin)、ウシ血清アルブミン、ウシチログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

## 【0060】

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100  $\mu$ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との特異的な結合性について、下記に示すような酵素免疫測定法 (ELISA; 酵素免疫測定法 第3版 医学書院 1987年、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル Chapter 14, Goding J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1996) などで確認する。

## 【0061】

酵素免疫測定法は以下のようにして行うことができる。

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし免疫動物より採取した血清を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。反応後、第二抗体を標識した物質に応じた検出反応を行い、抗体価を測定する。

## 【0062】

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体を、パーオキシダーゼ等の酵素やビ

オチン等で標識したものである。具体的には、免疫動物にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

#### 【0063】

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法（アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル）に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。該ポリクローナル抗体がFGF-8の活性を阻害する中和活性を有しているかどうかは下記の1.（4）に記載の細胞増殖阻害アッセイで調べることができる。

#### 【0064】

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物脾細胞、リンパ節、末梢血などから採取する。

#### 【0065】

##### （3）骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（Kohler G and Milstein C, Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976）、SP2/O-Ag14（Shulman M. et al., Nature, 276, 269-270, 1978）、P3-X63-Ag8653（Kearney J. F. et al., J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979）、P3-X63-Ag8（Kohler G and Milstein C, Nature, 256, 495-497, 1975）など、イン・ビトロ（in vitro）で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法（ア

ンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)に従い、細胞融合時までに  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

#### 【0066】

##### (4) 細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、塩化ナトリウム7.65g、蒸留水1L、pH7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT培地〔正常培地 (1.5mmol/Lグルタミン、 $5 \times 10^{-5}$ mol/L 2-メルカプトエタノール、10(g/mLゲンタマイシンおよび10%ウシ胎児血清を加えたRPMI 1640培地) に $10^{-4}$ mol/Lヒポキサンチン、 $1.5 \times 10^{-5}$ mol/Lチミジンおよび $4 \times 10^{-7}$ mol/Lアミノプテリンを加えた培地〕を用いる。

#### 【0067】

培養後、培養上清の一部をとり、下記の酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをFGF-8と特異的に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### 【0068】

酵素免疫測定法は1.(2)に記載したのと同様に行うが、第一抗体として、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の方法で得られる精製抗体を用いる。

モノクローナル抗体とFGF-8との特異的な結合は表面プラズモン共鳴 (Karlsson R. et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991) によっても評価できる。

#### 【0069】

抗FGF-8モノクローナル抗体の具体例としては、特開平9-271391

に記載されているマウス IgG1 サブクラスに属するハイブリドーマ KM1334 (FERM BP-5451) が生産するモノクローナル抗体 KM1334 があげられる。

#### 【0070】

上記で選択されたハイブリドーマが生産する抗 FGF-8 モノクローナル抗体が FGF-8 の活性を阻害できるか否かを、ターゲット細胞にマウス乳癌細胞株 SC-3 (Nakamura N. et al., J Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987)、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 (ATCC 番号: CRL-1658)、もしくはヒト前立腺癌細胞株 LNCaP (ATCC 番号: CRL-1740) を用いた増殖阻害アッセイにて調べる。方法としては、ターゲット細胞を FGF-8 (1 ~ 100 ng/mL) あるいはテストステロンを含む培地にて培養する際、培養上清もしくは下記 2. (5) にしたがって精製した抗 FGF-8 モノクローナル抗体の最終濃度が 0.001 ~ 100 µg/mL になるように段階希釈して培地中に添加する。24 ~ 72 時間培養後、MTT [3- (4, 5-ジメチル-2-チアゾル-2-イル) -2, 5-ジフェニル-2-H-テトラゾリウムブロマイド] 溶液、セルカウンティングキットもしくは WST-1 キットなどを用いて生細胞数を測定する。抗 FGF-8 モノクローナル抗体を添加しない場合に比べて抗 FGF-8 モノクローナル抗体の濃度依存的に生細胞数が減少する場合に、該抗 FGF-8 モノクローナル抗体は FGF-8 の活性を阻害する抗 FGF-8 中和抗体であることが確認できる。

#### 【0071】

また、ボルトン-ハンター法 (Bolton A. E. and Hunter W. M., Biochem. J., 133, 529-539, 1973) など <sup>125</sup>I 標識した FGF-8 の上記の細胞株への結合測定系を用いて、抗 FGF-8 モノクローナル抗体の FGF-8 の細胞表面上の受容体への結合阻害活性を測定することができる。

上記のモノクローナル抗体 KM1334 は、FGF-8 の活性を阻害する活性を有する抗 FGF-8 中和抗体であり、関節炎の予防薬または治療薬として好ましい。

#### 【0072】

### (5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン (Pristane) 処理〔プリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

#### 【0073】

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgGあるいはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

#### 【0074】

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられるが、特にマウスIgG1、IgG2a、ヒトIgG1タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性）および抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性）を有し、治療への応用上、有用である。

#### 【0075】

### 2. 抗FGF-8中和ヒト化抗体の作製方法

#### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のC領域であるCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターで



あり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築することができる。

【0076】

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体 $\gamma$ 1サブクラスのCH、 $\gamma$ 4サブクラスのCH、および $\kappa$ クラスのCL等があげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンより成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を組み込み、発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

【0077】

例えば、PAGE107 (特開平3-22979; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、PAGE103 (Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987)、PHSG274 (Brady G. et al., Gene, 27, 223-232, 1984)、PKCR (O'Hare K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527-1531, 1981)、SG1 $\beta$ d2-4 (Miyaji H. et al., Cytotechnology, 4, 173-180, 1990)等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー (Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987)、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー (Kuwana Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960-968, 1987)、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター (Mason J. O. et al., Cell, 41, 479-487, 1985)とエンハンサー (Gillies S. D. et al., Cell, 33, 717-728, 1983)等があげられる。

【0078】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖、L鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (タンデム型) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれ

る等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい (Shitara K. et al., J. Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994)。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (WO97/10354)、pEE18 (Bentley K. J. et al., Hybridoma, 17, 559-567, 1998) などがあげられる。

#### 【0079】

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体、例えば、マウス抗FGF-8中和モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得する。

#### 【0080】

マウス抗FGF-8中和モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウスFGF-8中和抗体産生ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

#### 【0081】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。ハイブリドーマから全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 (Okayama H. et al., Methods Enzymol., 154, 3-28, 1987)、また、全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(d

T) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング 第3版) などがあげられる。また、ハイブリドーマから mRNA を調製するキットとしては、ファストトラック (FastTrack) mRNA 単離キット (インビトロジェン社製)、クイックプレップ (QuickPrep) mRNA 精製キット (アマシャム・バイオサイエンシズ社製) などがあげられる。

#### 【0082】

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング 第3版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー)、あるいは市販のキット、例えば、cDNA 合成用スーパースクリプト・チョイス・システム (SuperScript Choice System for cDNA Synthesis, インビトロジェン社製) や ZAP-cDNA 合成キット [ストラタジーン (STRATAGENE) 社製]、タイムセーバー (TimeSaver) cDNA 合成キット (アマシャム・バイオサイエンシズ社製) を用いる方法などがあげられる。

#### 【0083】

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマから抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (ストラタジーン社製)、p Bluescript II SK (+) (ストラタジーン社製)、λ ZAP II (ストラタジーン社製)、λ gt10 (ストラタジーン社製)、λ gt11 (ストラタジーン社製)、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λ ExCell (アマシャム・バイオサイエンシズ社製)、p cD2 (Okayama H. and Berg P., Mol. Cell. Biol., 3, 280-289, 1983) および pUC18 (Yanisch-Perron C. et al., Gene, 33, 103-119, 1985) などのファージあるいはプラスミドベクターが用いられる。

#### 【0084】

ファージあるいはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' (ストラタジーン社製)、C600 (Appleyard R. K. Genetics,

39, 440-452, 1954)、Y1088 (Young R. A. and Davis R., Science, 222, 778-782, 1983)、Y1090 (Young R. A. and Davis R., Science, 222, 778-782, 1983)、NM522 (Gough J. A. and Murray N. E., J. Mol. Biol., 166, 1-19, 1983)、K802 (Wood W. B., J. Mol. Biol., 16, 118-133, 1966) および JM105 (Yanisch-Perron C. et al., Gene, 33, 103-119, 1985) などが用いられる。

#### 【0085】

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング 第3版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCRによりVHおよびVLをコードするcDNAを調製することもできる。

#### 【0086】

上記方法により選択されたcDNAの塩基配列は、適当なベクターにクローニングされた該cDNAを用いてジデオキシ法 (Sanger F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977) に基く反応を行い、ABI377 (アプライドバイオシステムズ社製) 等のDNAシーケンサーを用いて解析することで決定することができる。

#### 【0087】

(3) ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の解析とCDRのアミノ酸配列の同定

2. (2) で取得し、決定したcDNAの塩基配列から該cDNAがコードするVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991、以下、「シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト」と記す。) と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミ

ノ酸配列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。

#### 【0088】

さらに、任意のデータベース、例えばSWISS-PROTやPIR-Protein等に対して、BLAST (Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) など相同性検索プログラムを用いて、得られたVHおよびVLの完全なアミノ酸配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

#### 【0089】

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域（以下、FRと称す）とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個のCDR（CDR1、CDR2、CDR3）から成っている（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）。そしてVHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することにより同定することができる。

#### 【0090】

##### （4）抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターの構築

2. （1）で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを有するプラスミドを鋳型として、抗体のVHおよびVLを、適当な制限酵素の認識配列とV領域をコードする塩基配列よりなる5'末端側と3'末端側のプライマーを用いてPCR法により増幅し、

それぞれの増幅産物を pBluescript II SK (－) (ストラタジーン社製) などのプラスミドにクローニングし、2. (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。得られたプラスミドより、抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを単離し、2. (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

#### 【0091】

(5) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)などがあげられるが、それらの中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性、好ましくは60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

#### 【0092】

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレ

スト)を考慮して塩基配列に変換し、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、VH、VLとも6本の合成DNAを設計することが好ましい。また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、2.(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(-)(ストラタジーン社製)などのプラスミドベクターにクローニングし、2.(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望の抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

#### 【0093】

##### (6) ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに、移植しただけでは、その抗原結合活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている(Tempest P. R. et al., Bio/technology, 9, 266-271, 1991)。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている(Tempest P. R. et al., Bio/technology, 9, 266-271, 1991)。ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるF

Rのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析 (Bernstein F. C. et al., J. Mol. Biol., 112, 535-542, 1977) あるいはコンピューターモデリング (Tempest P. R. et al., Protein Engineering, 7, 1501-1507, 1994) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

#### 【0094】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAをプライマーとして用いてPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について2. (2)に記載の方法により、その塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認して、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター (以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す) を取得する。

#### 【0095】

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20～35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20～35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

#### 【0096】

##### (7) 抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターの構築

2. (1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流に、2. (5)および(6)で構築した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、抗



FGF-8 中和CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、  
2. (5) および (6) で抗FGF-8 中和CDR移植抗体のVHおよびVLを  
構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5' 末端に  
適当な制限酵素の認識配列を導入することで、2. (1) に記載のヒト化抗体発  
現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流にそれらが  
適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

## 【0097】

## (8) ヒト化抗体の一過性発現および活性評価

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、2.  
(4) 記載の抗FGF-8 中和キメラ抗体発現ベクター、2. (7) に記載の抗  
FGF-8 中和CDR移植抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベ  
クターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導  
入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる  
細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7細胞(AT  
CC番号:CRL-1651)が一般に用いられる(Warr G. W. et al., Metho  
ds in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1990)。COS-7細胞への  
発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法(Warr G. W. et al  
., Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1990)、リポフェク  
ション法(Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-741  
7, 1987)などがあげられる。

## 【0098】

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性  
は、第一抗体として培養上清を、第二抗体として標識した抗ヒトイムノグロブリ  
ン抗体を用いた1. (2) に記載の酵素免疫測定法などにより測定できる。また  
、FGF-8の活性を阻害する中和活性を保持しているかどうかを1. (4) に  
記載の細胞増殖阻害アッセイで確認することができる。

## 【0099】

## (9) ヒト化抗体の安定発現および活性評価

2. (4) 記載の抗FGF-8 中和キメラ抗体発現ベクターまたは2. (7)

に記載の抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換体を得ることができる。

# 【0100】

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法（特開平2-257891；Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990）等があげられる。

抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターまたは抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞（ATCC番号：CRL-1581）、マウスP3X63-Ag8.653細胞（ATCC番号：CRL-1580）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、DHFR遺伝子と称す）が欠損したCHO細胞（Urlaub G. and Chasin L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 1980）、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞（ATCC番号：CRL-1662、以下、YB2/0細胞と称す）等があげられる。

# 【0101】

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換体は、G418（G418 sulfate；シグマ・アルドリッチ社製）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる（Shitara K. et al., J. Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994）。動物細胞培養用培地としては、RPMI 1640培地（日水製薬社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL 302培地（JRHBバイオサイエンス社製）、IMDM培地（インビトロジェン社製）、Hybridoma-SFM培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にウシ胎児血清（FBS）などの各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換体を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は前記1.（4）に記載のELISAなどにより測定できる。また、形質転換体は、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる（Shitara K. et al., J. Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994）

## 【0102】

ヒト化抗体は、形質転換体の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル chapter 8; Goding J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1996）。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE; Laemmli U. K., *Nature*, 227, 680-685, 1970）やウエスタンブロットティング法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル chapter 12; Goding J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1996）等で測定する。

## 【0103】

精製したヒト化抗体の抗原結合活性は、第一抗体として精製ヒト化抗体を、第二抗体として標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた前記1.（2）に記載の酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴（Karlsson R. et al., *J. Immunol. Methods*, 145, 229-240, 1991）などにより測定できる。また、FGF-8の活性を阻害する中和活性を保持しているかどうかを1.（4）に記載の細胞増殖阻害アッセイで確認することができる。

## 【0104】

## 3. 抗体断片の作製

抗体断片は、1. および2. に記載の抗FGF-8中和モノクローナル抗体、抗FGF-8中和ヒト化抗体を元に遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、Diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

## 【0105】

## (1) Fabの作製

F a b は、抗 F G F - 8 中和抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテイン A 結合性を有する I g G サブクラスであれば、プロテイン A カラムに通すことで、I g G 分子や F c 断片と分離し、均一な F a b として回収することができる (Goding J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1996)。プロテイン A 結合性を持たない I g G サブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、F a b は低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる (Goding J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1996)。また、F a b は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、F a b 発現用ベクターにクローニングし、F a b 発現ベクターを作製することができる。F a b 発現用ベクターとしては、F a b 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、p I T 1 0 6 (Better M. et al., *Science*, 240, 1041-1043, 1988) などがあげられる。F a b 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に F a b を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある F a b とすることができ、また、ペリプラズマに発現させた場合は、培養上清中に活性を持った F a b が漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一な F a b を精製することができる (Borrebeck K., *Antibody Engineering: A Practical Guide*, Oxford University Press, 1991)。

#### 【0106】

##### (2) F ( a b ' ) <sub>2</sub> の作製

F ( a b ' ) <sub>2</sub> は、抗 F G F - 8 中和抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、F a b と同様の精製操作により、均一な F ( a b ' ) <sub>2</sub> として回収することができる (Goding J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1996)。また、3. (3) に記載の F a b ' を N, N' - オ - フェニレンジマレイミ

ドやビスマレイミドヘキササン等のようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、5、5' - ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) で処理し、ジスルフィド結合させる方法によっても作製することができる (McCafferty J. et al., Antibody Engineering: A Practical Approach, IRL Press, 1996)。

### 【0107】

#### (3) Fab' の作製

Fab' は、3. (2) に記載の  $F(ab')_2$  をジチオスレイトール等の還元剤で処理して得ることができる。また、Fab' は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab' 発現用ベクターにクローニングし、Fab' 発現ベクターを作製することができる。Fab' 発現用ベクターとしては、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (Carter P. et al., Bio/technology, 10, 163-167, 1992) などがあげられる。Fab' 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFab' を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFab' とすることができる。また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテインGカラム等を用いることにより、均一なFab' を精製することができる (McCafferty J. et al., Antibody Engineering: A Practical Approach, IRL Press, 1996)。

### 【0108】

#### (4) scFv の作製

scFv は遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌を用いて作製することができる。例えば、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAを、12残基以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドリ

ンカーをコードするDNAを介して連結し、s c F vをコードするDNAを作製する。ポリペプチドリンカーは、その付加がV H、V Lの抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えばPantolianoらにより示されたもの (Pantoliano M. W. et al., Biochemistry, 30, 10117-10125, 1991) あるいはそれを改変したものを用いることができる。

#### 【0109】

作製したDNAをs c F v発現用ベクターにクローニングし、s c F v発現ベクターを作製することができる。s c F v発現用ベクターとしては、s c F vのDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、p C A N T A B 5 E (アマシャム・バイオサイエンシズ社製)、P h f a (Lah M. et al., Hum. Antibodies Hybridomas, 5, 48-56, 1994) などがあげられる。s c F v発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面にs c F vがファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、s c F v発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層にs c F vを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるs c F vとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一なs c F vを精製することができる (McCafferty J. et al., Antibody Engineering: A Practical Approach, IRL Press, 1996)。

#### 【0110】

##### (5) D i a b o d y の作製

D i a b o d y は、上記のs c F vを作製する際のポリペプチドリンカーを3～10残基程度にすることで、作製することができる。1種類の抗体のV HおよびV Lを用いた場合には、2価のD i a b o d yを、2種類の抗体のV HおよびV Lを用いた場合は、2特異性を有するD i a b o d yを作製することができる (Le Gall F. et al., FEBS Lett., 453, 164-168, 1999, Courage C. et al.,

Int. J. Cancer, 77, 763-768, 1998)。

【0111】

(6) d s F v の作製

d s F v は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。まず、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体の V H および V L をコードする DNA の適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換された DNA を作製する。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は 2. (6) の PCR を用いた変異導入法により行うことができる。作製した各 DNA を d s F v 発現用ベクターにクローニングし、V H および V L の発現ベクターを作製することができる。d s F v 発現用ベクターとしては、d s F v 用の DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、p U L I 9 (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994) などがあげられる。V H および V L の発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に V H および V L を生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層から V H および V L を得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、ジスルフィド結合を形成させ、活性のある d s F v とすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994)。

【0112】

(7) C D R を含むペプチドの作製

C D R を含むペプチドは、F m o c 法あるいは t B o c 法等の化学合成法によって作製することができる。また、C D R を含むペプチドをコードする DNA を作製し、作製した DNA を適当な発現用ベクターにクローニングし、C D R ペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、C D R を含むペプチドをコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、p L E X (インビトロジェン社製)、p A X 4 a + [モビテック (MoBiTec) 社製] などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層に C D R を含むペプチドを生

成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズム層からCDRを含むペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994)。

#### 【0113】

##### (8) 活性の評価

上記の抗体断片の抗原結合活性は抗体断片を第一抗体として用いた前記1. (2) に記載の酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴 (Karlsson R. et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991) などにより測定できる。また、FGF-8の活性を阻害する中和活性を保持しているかどうかを1. (4) に記載の細胞増殖阻害アッセイで確認することができる。

#### 【0114】

##### 4. 本発明の予防薬および治療薬

抗FGF-8中和抗体は、滑膜や軟骨の細胞および組織上のFGF-8と結合し、FGF-8により誘導される軟骨の細胞外マトリックスの分解を抑制し、軟骨の破壊を抑制する能力を有するため、軟骨保護剤となる。また、該抗体はFGF-8により誘導される滑膜細胞の増殖を抑制する能力を有するため、滑膜細胞の増殖抑制剤となる。関節の破壊は、軟骨の破壊や滑膜細胞の増殖を伴うので、該抗体は滑膜細胞の増殖および軟骨の破壊を抑制することにより関節の破壊の抑制剤となる。関節炎は関節の破壊を伴う疾患であるので、該抗体は関節の破壊を抑制することにより関節炎の治療薬および予防薬となる。関節炎としては変形性関節症や関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強直性関節炎、乾癬性関節炎、椎間板疾患、急性結晶性滑膜炎（痛風、偽痛風を含む）などがあげられる。

#### 【0115】

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物のモノクローナル抗体と比較して、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において高い効果を示し、かつ免疫原性が低く、その効果が長期に渡り持続することが期待されるので、予防薬および治療薬として好ましい。

抗FGF-8中和抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一



緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【 0 1 1 6 】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、関節内、および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは関節内および静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【 0 1 1 7 】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【 0 1 1 8 】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【 0 1 1 9 】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および

気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体またはペプチドを微細な粒子として分散させ吸入を容易にさせる担体等を用いて調製される。

#### 【0120】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体またはペプチドおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ である。

#### 【0121】

抗FGF-8中和抗体が軟骨の細胞外マトリックスの分解を抑制すること、および滑膜細胞の増殖を抑制することは、以下(1)および(2)に示すイン・ビトロでのアッセイ系を用いて確認できる。また、関節炎の治療薬および予防薬になることは、以下(3)に示す関節炎病態モデル動物に該抗体を投与し、その関節炎症状を軽減できるかどうかによっても評価できる。

#### 【0122】

##### (1) FGF-8による軟骨破壊に対する阻害活性

軟骨の破壊は、軟骨細胞や軟骨器官を用いた軟骨の細胞外マトリックスの分解、軟骨細胞および滑膜細胞からの破壊因子の産生の増加を指標としたアッセイにより、軟骨破壊の進展による軟骨下骨の破壊は、骨吸収量を指標としたアッセイによりそれぞれ評価できる。

#### 【0123】

##### (a) 軟骨の細胞外マトリックスの分解

軟骨破壊作用は、初代培養したウサギ関節軟骨細胞を、FGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、培養後にプレートに残存する細胞外マトリックスの量を測定することにより評価できる。細胞外マトリックスの量はパパイン処理により遊離してきたグリコサミノグリカンの量として測定する。FGF-8により誘導される細胞外マトリックスの減少が、抗

F G F - 8 中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。

#### 【0124】

軟骨破壊作用は、Priceらの方法 (Price J. S. et al., Arthritis Rheum., 42, 137-147, 1999) に従って初代培養したウシ鼻中隔軟骨器官を、F G F - 8 存在下で抗 F G F - 8 中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、培養し、培養後の軟骨器官中の細胞外マトリックスの量を測定することによっても評価できる。F G F - 8 により誘導される細胞外マトリックスの減少が、抗 F G F - 8 中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。細胞外マトリックスの量は、培養後の器官をパパイン処理し、遊離してきたグリコサミノグリカンの量を、ジメチルメチレンブルー法 (Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987) にて測定するかまたは、コラーゲンの量を東京衛生年報, 36, 277, 1985に従いヒドロキシプロリン濃度として測定することにより測定できる。

#### 【0125】

##### (b) 軟骨破壊に関与する因子の産生

軟骨破壊に関与する因子としては、プロスタグランジン  $E_2$ 、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3、一酸化窒素をあげることができる。ウサギ関節軟骨細胞またはウサギ滑膜細胞を F G F - 8 存在下で抗 F G F - 8 中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、これらの因子の該細胞からの産生量として、培養上清のプロスタグランジン  $E_2$ 、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3あるいは一酸化窒素を測定する。F G F - 8 により促進されるプロスタグランジン  $E_2$ 、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3あるいは一酸化窒素の産生が、抗 F G F - 8 中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。

#### 【0126】

プロスタグランジン  $E_2$  は、プロスタグランジン  $E_2$  E I A システム (アマシャム・バイオサイエンス社製) により、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 は、ウサギマトリックスメタロプロテイナーゼ-3 E L I S A システム (アマ

シャム・バイオサイエンス社製)により、一酸化窒素はGriess試薬を用いる方法 (Green L. C. et al., Anal. Biochem. 126, 131-138 1982) により測定することができる。

#### 【0127】

##### (c) 骨吸収

骨吸収は、Kusanoらの方法 (Kusano K., et al., Endocrinology, 139, 1338-1345, 1998) に従って、マウス頭蓋冠をFGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、培養上清中のカルシウム濃度あるいはヒドロキシプロリン濃度を測定することにより評価できる。FGF-8により促進される骨吸収が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。培養上清中のカルシウム濃度は、カルシウムC-テストワコー (和光純薬工業社製) を用いて測定できる。また培養上清中のヒドロキシプロリン濃度は、東京衛生年報, 36, 277, 1985に従い測定できる。

#### 【0128】

##### (2) 滑膜細胞の増殖抑制作用

滑膜細胞の増殖は、ヒトやウサギの滑膜細胞をFGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み量の測定により評価できる。FGF-8により促進される $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み量が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は滑膜細胞の増殖抑制作用を有すると考えられる。

#### 【0129】

##### (3) 関節炎病態モデル動物を用いたイン・ビボでの評価

下記の関節炎病態モデル動物を用いて、FGF-8あるいは抗FGF-8中和抗体の関節破壊に対する効果を評価できる。関節炎病態モデル動物に抗FGF-8中和抗体を投与し、該モデル動物の関節炎の症状が軽減する場合に関節炎の治療薬や予防薬として用いることができると考えられる。

#### 【0130】

関節リウマチに類似した病態を示すモデル動物として、主として足関節に関節

炎が自然発症するMRL-*lpr/lpr*マウス (Hang L. et al., J. Exp. Med., 155, 1690-1701, 1982、日本チャールス・リバーより購入可能)、結核死菌を免疫して誘導されるラット・アジュバント関節炎モデル (Taurog J. D. et al., Cell. Immunol., 75, 271-282, 1983)、関節に多いII型コラーゲンをアジュバントとともに免疫して発症させるマウス・コラーゲン関節炎モデル (Stuart J. M. et al., Annu. Rev. Immunol., 2, 199-218, 1984)などをあげることができる。これらのモデル動物は関節リウマチと類似した病態を示し、関節炎治療薬の評価に広く用いられている。

#### 【0131】

ラット・アジュバント関節炎モデルを用いる場合は、経時的に後肢足蹠浮腫容積を測定する。また左右後肢の軟X線撮影を行い、骨破壊および関節の変形について評価する。さらに、全身の炎症反応の指標として血清中ムコ蛋白濃度をアスプロ-GP (大塚製薬)を用いて、血清中の一酸化窒素濃度をTraceyらの方法 (Tracey W. R., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 272, 1011-1015, 1995)に従いそれぞれ測定する。

#### 【0132】

マウス・コラーゲン関節炎モデルを用いる場合は体重と全肢の関節炎スコアの経時変化、血清中抗コラーゲン抗体価を測定する。さらに解剖後、関節部の病理組織学的検討を行う。関節炎スコアは一肢0から4点、全肢最高16点のスコアリングによって評価する。スコアの基準は、0：正常、1：弱い紅斑を認める、2：弱い腫脹と紅斑を認める、3：強い腫脹と紅斑を認め、触知により温感を認める、4：手指の変形を伴う著明な腫脹を認めるとする。

#### 【0133】

変形性関節症モデルとして、イヌ、ウサギなどの大動物を用い膝半月の切除や靱帯の切離によって関節に動揺性を生ぜしめ、慢性的な関節の変性を発生させるモデル (以下、実験的変形性関節症モデルと称する)が多く用いられている (伊藤隆太, 新薬開発のための動物モデル利用集成, 変形性関節症, R&Dプランニング, 1985年、Guingamp C. et al., Arthritis Rheum., 40, 1670-1679, 1997、van der Kraan P. M. et al., Am. J. Pathol., 135, 1001-1014, 1989)

。また、モノヨード酢酸の注入によるラット・モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルも変形性関節症モデルとしてあげられる。

#### 【0134】

ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症モデルは、Colomboらの方法 (Colombo C. et al., *Arthritis Rheum.*, 26, 875-886, 1983) および菊地らの方法 (菊地寿幸ら, *関節外科*, 15, 92-98, 1966) により作製できる。

ラット・モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルは、Guingampらの方法 (Guingamp C. et al., *Arthritis Rheum.*, 40, 1670-1679, 1997) に基き、ラットの膝関節内にモノヨード酢酸を注入して作製できる。

#### 【0135】

これらの変形性関節症モデル動物は一定期間後に膝関節膝蓋骨を摘出し、パパイン処理し、グリコサミノグリカンの量をジメチルメチレンブルー法 (Chandrasekhar S. et al., *Anal. Biochem.*, 161, 103-108, 1987) にて測定することにより関節破壊 (細胞外マトリックスの分解) を評価する。また、膝関節の病理組織学的検討を行う。

#### 【0136】

抗FGF-8中和抗体をモデル動物に投与する際の剤型および投与経路としては、対象となるモデル動物の性質や重篤度に応じて適宜選択することができる。例えば、それらをそのまま、または他の薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、希釈剤等と共に、モデル動物に対して、経口的または非経口的 (腹腔内、静脈内、関節内、筋肉内、皮下投与など) に投与することができる。

#### 【0137】

抗FGF-8中和抗体の配合量並びに投与量は、その製剤の投与方法、投与形態、使用目的、モデル動物の具体的症状、モデル動物の体重などに応じて個別に決定され、特に限定されないが、投与量として、1日当たり概ね  $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$  程度を、投与間隔として1日1回程度でも可能であり、1日2～4回、またはそれ以上の回数に分けて投与することもできる。また、例えば点滴などにより連続的に投与することも可能である。関節などの局所に投与する場合には、1個所に概ね  $1 \text{pg}$  から  $100 \text{mg}$  を投与する。

## 【0138】

## 5. 本発明の診断薬

FGF-8は関節における滑膜細胞の増殖、軟骨の細胞外マトリックスの破壊を誘導する。上述した抗FGF-8抗体は、FGF-8と特異的に結合し、FGF-8を検出および定量できるので、関節炎の診断薬として用いることができる。診断できる関節炎としては、上記4.に記載した疾患があげられる。FGF-8の検出および定量は、下記6.に示す方法により行うことができる。

## 【0139】

本発明の診断薬に使用される抗FGF-8抗体としては、FGF-8に特異的に結合する抗体であればいかなるものでもよく、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、ヒト化抗体およびこれらの抗体の抗体断片をあげることができる。

## 【0140】

本発明の診断薬で使用される、抗FGF-8抗体は、上記の抗FGF-8中和抗体の製造法と同様にして製造することができるが、FGF-8の活性を阻害することを要しない。抗FGF-8中和抗体を、本発明の診断薬として使用される抗FGF-8抗体として用いることもできる。本発明の診断薬に用いられる抗FGF-8抗体の具体例としては、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451)が生産するモノクローナル抗体KM1334、形質転換体KM3034 (FERM BP-7836)が生産するヒト型キメラ抗体KM3034があげられる。

## 【0141】

抗FGF-8抗体を含有する診断薬は、下記6.に示すような判定方法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩等が挙げられる。検出用試薬としては、抗FGF-8抗体を認識する標識された二次抗体、標識に対応した基質等の通常の免疫学的検出法に用いられる試薬があげられる。

## 【0142】

## 6. 本発明の関節炎の判定方法

本発明の判定方法で判定される関節炎としては、上記4.に記載した疾患があげられる。これらの疾患の患者の関節では、健常者と比較して、滑膜細胞の増殖、軟骨の細胞外マトリックスの破壊を誘導する活性をもつFGF-8の量が増加していると考えられる。

## 【0143】

本発明の関節炎の判定方法としては、例えば、バイオプシー等で被験者より採取した関節の滑膜や軟骨の細胞または組織切片、および該細胞または組織より調製した細胞抽出液、滑液等を用いて、細胞あるいは組織に存在するFGF-8を下記に述べるように、免疫学的に検出および／または定量する方法があげられる。

## 【0144】

FGF-8に対する抗体を用いて関節に発現したFGF-8を免疫学的に検出および／または定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法（富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック，1987年、日本生化学会，続生化学実験講座5，免疫生化学研究法，東京化学同人，1986年）などを用いることができる。

## 【0145】

蛍光抗体法は、文献（Goding J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1996、富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック，1987年）等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した関節の細胞あるいは組織などに、抗FGF-8抗体を反応させ、さらにフルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）あるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。



## 【0146】

酵素免疫測定法（E L I S A）は、分離した関節の細胞あるいは組織、滑液などに、抗 F G F - 8 抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

## 【0147】

放射性物質標識免疫抗体法（R I A）は、分離した関節の細胞あるいは組織、滑液などに、抗 F G F - 8 抗体を反応させ、さらに放射性同位体標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで放射能を測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法は、分離した関節の細胞あるいは組織などに、抗 F G F - 8 抗体を反応させ、さらに F I T C などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素等で標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させ、酵素標識の場合は酵素反応により発色する基質を加えて反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法であり、文献（Goding J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1996、富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック，1987年）等に記載された方法を用いて行うことができる。

## 【0148】

ウェスタンブロッティングは、分離した関節の細胞あるいは組織、それらの破碎液、滑液などを S D S を含むサンプル用緩衝液に溶解させて S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのち、ポリフッ化ビニリデン（P V D F）膜に転写し、抗 F G F - 8 抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色あるいは化学発光する基質を加えて反応させ、バンドとして検出する方法である。

## 【0149】

免疫沈降法は、分離した関節の細胞あるいは組織の破碎液、滑液とビーズ等に

固定化した抗FGF-8抗体を反応させ、遠心等によりビーズを単離した後、ビーズをSDSを含むサンプル用緩衝液で処理して、溶解させたFGF-8をウェスタンブロッティング等により検出する方法である。

# 【0150】

サンドイッチELISA法はエピトープがそれぞれ異なる2種類の抗FGF-8抗体を用いた酵素免疫測定法の一つである。一方の抗FGF-8抗体をプレート上に固定し、分離した関節の細胞あるいは組織、それらの破碎液、滑液を反応させた後、プレート上の抗FGF-8抗体に結合したFGF-8にさらにもう一方の抗FGF-8抗体を反応させる。ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

以下に、本発明の実施例を示す。

# 【0151】

## 【実施例】

実施例1 ウサギ軟骨細胞のFGF-8による細胞外マトリックスの分解と抗体による阻害

ウサギ関節軟骨細胞は、3週齢の雌性ニュージーランドホワイト種ウサギの両膝および肩よりTamuraらの方法(Tamura T. et al., Eur. J. Pharmacol., 419, 269-274, 2001)に従って分離培養した。すなわち両膝関節および両肩関節を摘出し、骨端軟骨を採取した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、軟骨を細切し、0.4w/v%アクチナーゼEを含む10v/o1%FBS添加DMEM(以下、FBSを含むDMEMをFBS/DMEMと記す)中で37℃で1時間、さらに0.025w/v%コラゲナーゼPを含む10v/o1%FBS/DMEM中で37℃、5~6時間処理することにより軟骨細胞を軟骨組織から分離し、採取した。採取した軟骨細胞を10v/o1%FBS/DMEMに懸濁し、100,000個/mLになるように調製した。この軟骨細胞を含む培養液を24穴プレートの各ウェルに1mLずつ播種して5%CO<sub>2</sub>-95%air気相下、37℃にて培養した。軟骨細胞がコンフルエントに達した後、培養液を0.5v/o1%FBS/D

MEMに置換し24時間培養した。培養液を除去し、0.5 vol % FBS / DMEM (コントロール、無刺激)、FGF-8 [1、10または100 ng / mL ; ペプロテック (Peprotech) 社製] を含む0.5 vol % FBS / DMEM、またはFGF-8 (100 ng / mL) と抗FGF-8抗体KM1334 (1、3または10  $\mu$ g / mL) とを含む0.5 vol % FBS / DMEMを1 mL 添加して48時間培養した。培養液を除去し、プレートに残った細胞外マトリックス中のグリコサミノグリカンの量をジメチルメチレンブルー (DMMB) 法 (Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987) にて測定した。すなわち、5 mmol / L L-システイン塩酸塩一水和物を加えて活性化した保存用パイン緩衝液 (0.1 mol / L 酢酸ナトリウム、50 mmol / L EDTA、pH 5.8) に最終濃度が20  $\mu$ g / mLになるようにパイン (シグマ・アルドリッチ社製) を加え、この液を上記の軟骨細胞を培養したプレートの各ウェルに1 mLずつ添加し、60℃で一晩消化した。この消化液75  $\mu$ L に塩酸グアニジン緩衝液 (2.88 mol / L 塩酸グアニジン、0.05 mol / L 酢酸ナトリウム、pH 6.8) 25  $\mu$ L とDMMB溶液200  $\mu$ L を添加し、530 / 590 nmの吸光度を測定し、スタンダードとして使用したコンドロイチン硫酸 (サメ軟骨由来、生化学工業社製) の吸光度から各サンプルのグリコサミノグリカンの濃度を算出した。実験は各条件とも3例ずつ行い、平均値と標準偏差 (SE) を求めた。

## 【0152】

その結果を図1および2に示す。FGF-8は100 ng / mLの濃度で細胞外マトリックス中のグリコサミノグリカン残存量を有意に低下させた (図1)。このことは、FGF-8が軟骨の細胞外マトリックスの分解を促進する作用を有することを示している。また、抗FGF-8抗体KM1334はFGF-8による軟骨の細胞外マトリックスの分解促進を3  $\mu$ g / mL以上の抗体濃度で有意に抑制した (図2)。したがって、抗FGF-8中和抗体の投与により、関節炎における細胞外マトリックスの分解を抑制することができる。

## 【0153】

実施例2 ウサギ滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進と抗体による阻害

ウサギ滑膜細胞はHamiltonらの方法 (Hamilton J. A. and Slywka J., J. Immunol. 126, 851-855, 1981) に準じて採取した。分離した滑膜細胞を10 vol % FBSを含むRPMI 1640培地 (以下、FBSを含むRPMI 1640培地をFBS/RPMI 1640と記す) 中に懸濁し、10,000個ずつ96ウェルの培養プレートに播種した。24時間培養後、各ウェルの培養液を除去し、0.2 vol % FBS/RPMI 1640 (コントロール、無刺激)、FGF-8 (1, 10または100 ng/mL) を含む0.2 vol % FBS/DMEM、またはFGF-8 (100 ng/mL) と抗FGF-8抗体KM1334 (0.1, 0.3, 1, 3または10  $\mu$ g/mL) とを含む0.2 vol % FBS/RPMI 1640を各ウェルに添加した。48時間培養後、1ウェルあたり9.25 kBqの [ $^3$ H] チミジンを添加してさらに24時間培養し、細胞内に取り込まれた [ $^3$ H] チミジンの放射活性を測定した。実験は各条件とも6例ずつ行い、平均値と標準偏差 (SE) を求めた。

## 【0154】

その結果を図3および4に示す。FGF-8は100 ng/mLの濃度でウサギ滑膜細胞への [ $^3$ H] チミジンの取り込みを有意に促進した (図3)。このことはFGF-8がウサギ滑膜細胞の増殖を促進する作用を有していることを示している。また、抗FGF-8抗体KM1334は、このFGF-8依存性の [ $^3$ H] チミジンの取り込みの促進を0.3  $\mu$ g/mLの抗体濃度から有意に抑制した (図4)。したがって、抗FGF-8中和抗体の投与により、関節炎における滑膜の増殖を抑制することができる。

## 【0155】

実施例3 ヒト滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進と抗体による阻害

リウマチ患者由来のヒト滑膜細胞 (東洋紡より購入) を用いて、実施例2と同様の実験を行った。ただしFGF-8の濃度は10, 100または500 ng/mLで行い、抗FGF-8抗体KM1334と共存させるFGF-8の濃度は500 ng/mLにした。

## 【0156】

その結果を図5および6に示す。FGF-8は500 ng/mLの濃度でヒト

滑膜細胞への [ $^3\text{H}$ ] チミジンの取り込みを有意に促進した (図5)。このことは FGF-8 がヒト滑膜細胞の増殖を促進する作用を有していることを示している。また、抗 FGF-8 抗体 KM1334 はこの FGF-8 依存性の [ $^3\text{H}$ ] チミジンの取り込みの促進を  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  の抗体濃度から有意に抑制した (図6)。したがって、抗 FGF-8 中和抗体の投与により、関節炎における滑膜の増殖を抑制することができる。

【0157】

#### 実施例4 抗 FGF-8 抗体を使用した滑膜の染色

ヒト関節リウマチ患者より摘出した滑膜を、文献の方法 (Tanaka A. et al, Cancer Res. 58, 2053-2056, 1998) に従いパラフィン切片を作成し、抗 FGF-8 抗体 KM1334 を用いて組織免疫染色を行った。その結果、ヒト関節リウマチ滑膜4例中3例の滑膜細胞では FGF-8 が陽性であった。したがって、FGF-8 はヒト滑膜に存在することが確認された。また、抗 FGF-8 抗体を用いて、ヒト関節リウマチの滑膜細胞の検出することにより、ヒト関節リウマチの判定が可能なことが示された。

【0158】

#### 参考例1 抗 FGF-8 中和キメラ抗体の作製

1. マウスの抗 FGF-8 中和抗体のV領域をコードする cDNA の単離、解析
  - (1) マウスの抗 FGF-8 中和抗体生産ハイブリドーマ細胞からの mRNA の調製

マウスの抗 FGF-8 中和モノクローナル抗体 (以下、抗 FGF-8 中和マウス抗体と称する) を生産するハイブリドーマ KM1334 (FERM BP-5451) の  $1 \times 10^7$  細胞より、mRNA の調製キットであるファストトラック・mRNA 単離キット (インビトロジェン社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、mRNA を約  $8\text{ }\mu\text{g}$  調製した。

【0159】

- (2) 抗 FGF-8 中和マウス抗体のH鎖およびL鎖 cDNA ライブラリーの作製

参考例1の1項(1)で取得した KM1334 の mRNA の  $5\text{ }\mu\text{g}$  から、タイ

ムセーバー cDNA 合成キット (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端に EcoRI - NotI アダプターを有する cDNA を合成した。作製した cDNA 全量を  $20 \mu\text{L}$  の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG クラスの抗体の H 鎖に対応する約  $1.5 \text{ kb}$  の cDNA 断片と  $\kappa$  クラスの L 鎖に対応する約  $1.0 \text{ kb}$  の cDNA 断片をそれぞれ約  $0.1 \mu\text{g}$  回収した。次に、各々の約  $1.5 \text{ kb}$  の cDNA 断片  $0.1 \mu\text{g}$  および約  $1.0 \text{ kb}$  の cDNA 断片  $0.1 \mu\text{g}$  と、制限酵素 EcoRI で消化後、仔ウシ小腸由来アルカリフォスファターゼで末端を脱リン酸化した  $\lambda$  ZAP II ベクター  $1 \mu\text{g}$  を  $\lambda$  ZAP II クローニング・キット (ストラタジーン社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後の各々の反応液のうち  $4 \mu\text{L}$  をギガパック II パッケージング・エクストラクト・ゴールド (Gigapack II Packaging Extracts Gold, ストラタジーン社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、 $\lambda$  ファージにパッケージングし、適当量を大腸菌株 XL1-Blue (ストラタジーン社製、Biotechniques, 5, 376, 1987) に感染させて、KM1334 の H 鎖 cDNA ライブラリーおよび L 鎖 cDNA ライブラリーとしてそれぞれ約  $8.1 \times 10^4$  個と、 $5.5 \times 10^4$  個のファージクローンを取得した。次に各々のファージを常法 (モレキュラー・クローニング 第3版) に従い、ナイロンメンブレン上に固定した。

#### 【0160】

#### (3) 抗 FGF-8 中和マウス抗体の H 鎖および L 鎖 cDNA のクローニング

参考例 1 の 1 項 (2) で作製した KM1334 の H 鎖 cDNA ライブラリーおよび L 鎖 cDNA ライブラリーのナイロンメンブレンを、ECL 直接核酸標識検出システム (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems, アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体の C 領域の cDNA [H 鎖はマウス  $\text{C}\gamma 1$  cDNA を含む DNA 断片 (French D. L. et al., J. Immunol., 146, 2010-2016, 1991)、L 鎖はマウス  $\text{C}\kappa$  cDNA を含む DNA 断片 (Hieter P. A. et al., Cell, 22, 197-207, 1980)] をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンを H 鎖、L 鎖各 10 クローン取得した。次に、 $\lambda$  ZAP II クローニング・キット (ストラタ

ジーン社製)の使用説明書に従い、イン・ビボ・エクシジョン (in vivo excision) 法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれる cDNA の塩基配列をビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン 2 (Big Dye Terminator Kit Ver.2、アプライド・バイオシステムズ社製) を用いてジデオキシ法 (モレキュラー・クローニング 第3版) により決定した。その結果、cDNA の 5' 末端に開始コドンと推定される ATG 配列が存在する完全長の機能的な H 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1334H7-1 および L 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1334L7-1 を得た。

#### 【0161】

##### (4) 抗 FGF-8 中和マウス抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

配列番号 1 にプラスミド pKM1334H7-1 に含まれていた VH の全塩基配列を、配列番号 2 に推定された全アミノ酸配列を、配列番号 3 にプラスミド pKM1334L7-1 に含まれていた VL の全塩基配列を、配列番号 4 に推定された全アミノ酸配列をそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ (シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) との比較および精製した抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (島津製作所製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 をコードする完全長 cDNA であり、H 鎖については配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 1 から 19 番目が、L 鎖については配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の 1 から 19 番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

#### 【0162】

次に、抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 の VH および VL のアミノ酸配列 (分泌シグナル配列を除いた配列) の新規性について検討した。配列解析システムとして GCG パッケージ [バージョン 9.1、ジェネティクス・コンピューター・グループ (Genetics Computer Group) 社製] を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース (PIR-Protein リリース 56.0) を B

LAST (Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により検索した。その結果、H鎖、L鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHおよびVLは新規なアミノ酸配列であることが確認された。

#### 【0163】

また、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHおよびVLのCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHのCDR1、2および3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5、6および7に、VLのCDR1、2および3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号8、9および10に示した。

#### 【0164】

### 2. 抗FGF-8中和キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

(1) 抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334の構築  
WO97/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と参考例1の1項(3)で得られたプラスミドpKM1334H7-1およびpKM1334L7-1を用いて抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334を以下の様にして構築した。

#### 【0165】

参考例1の1項(3)で得られたプラスミドpKM1334H7-1の50 ngを鋳型とし、配列番号11、12に記載の塩基配列を有する合成DNA (ジェンセット (GENSET) 社製) をプライマーとして終濃度0.3  $\mu\text{mol/L}$ となるように加え、KODプラス・ポリメラーゼ (東洋紡績社製) を用いて添付の取扱説明書に従い、50  $\mu\text{L}$ の系でまず94℃で2分間加熱した後、94℃15秒間、55℃30秒間、68℃1分間の条件で30サイクルのPCRを行った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) および10単位の制限酵素NotI [ニュー・イングランド・バイオラプズ (New England Biolabs) 社製] を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47 kbのApaI-NotI断片を約0.3  $\mu\text{g}$ 回収した。



## 【0166】

次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 ApaI および 10 単位の制限酵素 NotI を用いて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 12.75 kb の ApaI - NotI 断片を約 2  $\mu$ g 回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の NotI - ApaI 断片 0.1  $\mu$ g とプラスミド pKANTEX93 由来の NotI - ApaI 断片 0.1  $\mu$ g を全量 10  $\mu$ L の滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ (Ligation High, 東洋紡績社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、図 7 に示したプラスミド pKANTEX1334H を得た。

## 【0167】

次に、参考例 1 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334L7-1 の 50 ng を鋳型とし、配列番号 13、14 に記載の塩基配列を有する合成 DNA (ジェンセット社製) をプライマーとして終濃度 0.3  $\mu$ mol/L となるように加え、KOD プラス・ポリメラーゼを用いて添付の取扱説明書に従い、50  $\mu$ L の系でまず 94℃ で 2 分間加熱した後、94℃ 15 秒間、55℃ 30 秒間、68℃ 1 分間の条件で 30 サイクルの PCR 反応を行った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 BsiWI (ニュー・イングランド・バイオラビズ社製) を用いて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.44 kb の EcoRI - BsiWI 断片を約 0.3  $\mu$ g 回収した。

## 【0168】

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX1334H の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 EcoRI および制限酵素 BsiWI を用いて 37℃ で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.20 kb の EcoRI - BsiWI 断片を約 2  $\mu$ g 回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の EcoRI - BsiWI 断片 0.1  $\mu$

gとプラスミドpKANTEX1334H由来のEcoRI-BsiWI断片0.1  $\mu$ gを全量10  $\mu$ Lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、図7に示したプラスミドpKANTEX1334を得た。

## 【0169】

得られたプラスミドの400 ngを用い、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いてジデオキシ法による塩基配列の解析を行った結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

## 【0170】

(2) 抗FGF-8中和キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記参考例1の2項(1)で得られた抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334を用いて抗FGF-8中和キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

## 【0171】

プラスミドpKANTEX1334の4  $\mu$ gを $1 \times 10^6$ 細胞のDHFR遺伝子欠損CHO細胞 (Urlaub G. et al., Cell, 33, 405-412, 1983) ヘエレクトロポレーション法 (Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、30 mLのIMDM-1 $\times$ HTサプルメント-FBS (10) [10%透析FBSと1 $\times$ HTサプルメントを含むIMDM培地 (何れもインビトロジェン社製)] に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (岩城硝子社製) に100  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、培養液をIMDM-FBS (10) (10%透析FBSを含むIMDM培地) と交換してさらに1~2週間培養した。耐性コロニーが出現しコンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗FGF-8中和キメラ抗体の抗原結合活性を参考例1の2項(3)に示すELISAにより測定した。

## 【0172】

培養上清中に抗FGF-8中和キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換体については24ウェルプレートに播種し、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、DHFR遺伝子産物のDHFRの阻害剤であるメソトレキセート(MTX; シグマ・アルドリッチ社製)を50nM含むIMDM-FBS(10)で2週間培養した。更に200nM、500nMとMTXの濃度をあげてそれぞれの段階で2週間ずつ培養を行い、500nmol/L MTX耐性を示す形質転換体を誘導した。形質転換体がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗FGF-8中和キメラ抗体の抗原結合活性を参考例1の2項(3)に示すELISAにより測定した。最終的に、MTXを500nMの濃度で含むIMDM-FBS(10)で増殖可能かつ、抗FGF-8中和キメラ抗体を高発現する形質転換体を得た。得られた形質転換体については、2回の限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行い、抗FGF-8中和キメラ抗体の発現の最も高い形質転換体のクローンをKM3034と命名した。また、形質転換体クローンKM3034が生産する抗FGF-8中和キメラ抗体をKM3034と命名した。

#### 【0173】

##### (3) 抗体のFGF-8に対する結合活性の測定(ELISA)

FGF-8-b [R&Dシステムズ(R&D Systems)社製]を10 $\mu$ g/mLとなるようにPBSに溶解し、96ウェルのELISA用プレート[グライナー(Greiner)社製]の各ウェルにそれぞれ50 $\mu$ Lずつ分注して室温で2時間静置し、プレート表面へ吸着させた。FGF-8溶液を取り除いた後、1%BSAを含むPBS(BSA-PBS)を100 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。BSA-PBSを捨て、形質転換体の培養上清、精製したマウス抗体または精製したヒト化抗体の各種希釈溶液を50 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS(Tween-PBS)で洗浄後、マウス抗体を添加したウェルにはBSA-PBSで400倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIg抗体溶液[ダコ(DAKO)社製]を、ヒト化抗体を添加したウェルにはBSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗Ig

G (H+L) 抗体溶液を二次抗体溶液として、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液〔2, 2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの $0.55 \text{ g}$ を $1 \text{ L}$ の $0.1 \text{ M}$ クエン酸緩衝液( $\text{pH} 4.2$ )に溶解し、使用直前に過酸化水素を $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ で添加した溶液〕を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、 $415 \text{ nm}$ の吸光度( $\text{OD} 415$ )を測定し、抗体の結合活性を測定した。

【0174】

#### 参考例2 抗FGF-8中和CDR移植抗体の作製

##### 1. 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの構築

(1) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

まず、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。参考例1の1項(4)で同定した抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHのCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性から3種類のサブグループ(HSG I~III)に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられることから、それら共通配列を基に抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を設計することとした。より活性の高い抗FGF-8中和CDR移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のVHの3種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM1334のVHのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。第1表には、相同性の検索結果を示した。第1表に示した様に、KM1334のVH領域のFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

【0175】

【表 1】

第 1 表

ヒト抗体の VH の各サブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列と KM1334 の VH の FR のアミノ酸配列との間の相同性

<u>HSGI</u>	<u>HSGII</u>	<u>HSGIII</u>
79.3%	51.7%	59.8%

【0176】

以上の結果から、ヒト抗体の VH のサブグループ I の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 の VH の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 15 に記載の抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV. 0 を設計した。

次に、抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を以下の様にして設計した。参考例 1 の 1 項 (4) で同定した抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 の VL の CDR のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体の VL の FR のアミノ酸配列を選択した。VH の場合と同様に、ヒト抗体の VL の 4 種類のサブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列のうち、KM1334 の VL の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有する FR のアミノ酸配列を選択した。第 2 表には、相同性の検索結果を示した。第 2 表に示した様に、KM1334 の VL の FR のアミノ酸配列はサブグループ II と最も高い相同性を有していた。

【0177】

【表 2】

第 2 表

ヒト抗体の VL の各サブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列と KM1334 の VL の FR のアミノ酸配列との間の相同性

<u>HSGI</u>	<u>HSGII</u>	<u>HSGIII</u>	<u>HSGIV</u>
66.3%	83.8%	66.2%	73.8%

【0178】

以上の結果から、ヒト抗体の VL のサブグループ II の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 の VL の CDR

のアミノ酸配列を移植し、配列番号16に記載の抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.0を設計した。

上記で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト型CDR移植抗体では、マウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは活性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本参考例においても、活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定することを検討した。まず、上記で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0よりなる抗体V領域(HV0LV0)の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM [オックスフォード・モレキュラー (Oxford Molecular) 社製] を、三次元構造の表示についてはソフトウェアPro-Explore (オックスフォード・モレキュラー社製) あるいはRasMol [グラクソ (Glaxo) 社製] を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列において、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334と異なっている残基について順次、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334の相当する位置に見られる残基へ改変したアミノ酸配列からなる三次元構造モデルを同様にして構築し、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334、HV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較した。その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えると考えられる残基として、HV.0では12番目のLys、13、40番目のAla、41番目のPro、48、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84、87番目のArg、95番目のTy

r を、LV. 0 では 2 番目の Ile、3 番目の Val、14、15、50 番目の Gln、51 番目の Leu、92 番目の Tyr を選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも 1 つ以上をマウス抗体 KM1334 に見られるアミノ残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を設計した。

#### 【0179】

(2) 抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の VH をコードする cDNA の構築

参考例 2 の 1 項 (1) で設計した抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV. 0 をコードする cDNA を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

#### 【0180】

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号 2 に記載の抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 の H 鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1 つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体 V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、更に 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 17 から 22 の 6 本の合成オリゴヌクレオチドを合成した (ジェンセット社製)。

#### 【0181】

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が  $0.1 \mu\text{mol/L}$  となる様に  $50 \mu\text{L}$  の反応液に加えて、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  M13 プライマー RV (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  M13 プライマー M4 (宝酒造社製) および 1 単位の KO

Dポリメラーゼ（東洋紡績社製）を用いて、KODポリメラーゼに添付の使用説明書に従い、PCR反応を行った。この際の反応条件は使用説明書に記された条件（94℃ 30秒間、50℃ 30秒間、74℃ 60秒間のサイクルを30サイクル）に従った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素HindIII（宝酒造社製）および10単位の制限酵素NotI（ニュー・イングランド・バイオラプズ社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのHindIII-NotI断片を約0.3μg回収した。

#### 【0182】

次に、プラスミドpBlue-script SK（-）（ストラタジーン社製）の3μgを10単位の制限酵素HindIIIおよび10単位の制限酵素NotIを用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのHindIII-NotI断片を約2.9μg回収した。

#### 【0183】

次に、上記で得られた抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのPCR産物のHindIII-NotI断片0.1μgとプラスミドpBlue-script SK（-）のHindIII-NotI断片0.1μgを全量10μLの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、形質転換体の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する図8に示したプラスミドp hKM1334HV0を得た。

#### 【0184】

次に、参考例2の1項（1）で設計したFRのアミノ酸残基の改変は以下のように行った。例えば、12番目のLysをAlaに改変する際には、配列番号18に記載のオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号23に記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドp hKM1334HV0の構築と同様の反応を



行うことにより、目的の塩基配列を有する図9に示したプラスミドp hKM1334HV12を得た。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体KM1334で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

#### 【0185】

また、例えば、68番目のValをAlaに改変する際には、本項で作製したプラスミド p hKM1334HV0の50ngを鋳型とし、配列番号24に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成DNA（ジェンセット社製）およびM13プライマーRV（宝酒造社製）をプライマーとしてそれぞれ終濃度0.3  $\mu\text{mol/L}$ となるように加え、KODプラス・ポリメラーゼ（東洋紡績社製）を用いて添付の取扱説明書に従い、50  $\mu\text{L}$ の系でまず94℃で2分間加熱した後、94℃15秒間、55℃30秒間、68℃1分間の条件で30サイクルのPCR反応を行った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素SacII（宝酒造社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.30kbのSacII断片を約0.3  $\mu\text{g}$ 回収した。

#### 【0186】

次に、プラスミドp hKM1334HV0の3  $\mu\text{g}$ を10単位の制限酵素SacIIを用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.04kbのSacII-SacII断片を約2.5  $\mu\text{g}$ 回収した。

次に、上記で得られたPCR産物由来のSacII-SacII断片0.1  $\mu\text{g}$ とプラスミドp hKM1334HV0由来のSacII-SacII断片0.1  $\mu\text{g}$ を全量10  $\mu\text{L}$ の滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、形質転換体の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する図10に示したプラスミドp hKM1334HV68を得た。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体KM1334で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

## (3) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築

参考例2の1項(1)で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.0をコードするcDNAをVHと同様にPCR法を用いて以下の様にして構築した。ただし、分泌シグナル配列としては、配列番号4に記載の抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のL鎖の配列を用いた。

## 【0187】

まず、配列番号25、26、27、28、29および30に記載の塩基配列を有する6本の合成オリゴヌクレオチドを合成した(ジェンセット社製)。各オリゴヌクレオチドを最終濃度が $0.1 \mu\text{mol/L}$ となる様に $50 \mu\text{L}$ の反応液に加えて、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  M13プライマーRV(宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{mol/L}$  M13プライマーM4(宝酒造社製)および1単位のKODポリメラーゼ(東洋紡績社製)を用いて、KODポリメラーゼに添付の使用説明書に従い、PCR反応を行った。この際の反応条件は使用説明書に記された条件( $94^{\circ}\text{C}$  30秒間、 $50^{\circ}\text{C}$  30秒間、 $74^{\circ}\text{C}$  60秒間のサイクルを30サイクル)に従った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および10単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製)を用いて $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 $0.44 \text{ kb}$ のEcoRI-HindIII断片を約 $0.3 \mu\text{g}$ 回収した。

## 【0188】

次に、プラスミドpBluescript SK(-)(ストラタジーン社製)の $3 \mu\text{g}$ を10単位の制限酵素EcoRIおよび10単位の制限酵素HindIIIを用いて $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 $2.95 \text{ kb}$ のEcoRI-HindIII断片を約 $2.9 \mu\text{g}$ 回収した。

## 【0189】

次に、上記で得られた抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのPCR産物のEcoRI-HindIII断片 $0.1 \mu\text{g}$ とプラスミドpBluescript SK(-)のEcoRI-HindIII断片 $0.1 \mu\text{g}$ を全量 $10 \mu\text{L}$ の滅菌

水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、形質転換体の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する図11に示したプラスミドp hKM1334LV0を得た。

#### 【0190】

次に、参考例2の1項(1)で設計したFRのアミノ酸残基の改変は以下に示すいずれかの方法で行った。例えば、92番目のTyrをPheに改変する際には、配列番号29に記載のオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号31に記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドp hKM1334LV0の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有する図12に示したプラスミドp hKM1334LV92を得た。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体KM1334に見られる遺伝子コドンとなるように行った。

#### 【0191】

また、例えば、2番目のIleをValに改変する際には、本項で作製したプラスミドp hKM1334LV0の50ngを鋳型とし、配列番号32に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成DNA（ジェンセット社製）およびM13プライマーRV（宝酒造社製）をプライマーとしてそれぞれ終濃度0.3μmol/Lとなるように加え、KODプラス・ポリメラーゼ（東洋紡績社製）に添付の取扱説明書に従い、50μLの系でまず94℃で2分間加熱した後、94℃15秒間、55℃30秒間、68℃1分間の条件で30サイクルのPCR反応を行った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素Tth111I（宝酒造社製）およびEcoRI（宝酒造社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.08kbのEcoRI-Tth111I断片を約0.2μg回収した。

#### 【0192】

次に、プラスミドp hKM1334LV0の3μgを10単位の制限酵素Tt

h1111IおよびEcoRIを用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.42kbのEcoRI-Tth1111I断片を約2.6μg回収した。

次に、上記で得られたPCR産物由来のEcoRI-Tth1111I断片0.1μgとプラスミドp hKM1334LV0由来のEcoRI-Tth1111I断片0.1μgを全量10μLの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、形質転換体の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2（アプライド・バイオシステムズ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する図13に示したプラスミドp hKM1334LV2を得た。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体KM1334に見られる遺伝子コドンとなるように行った。

#### （4）抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターの構築

WO97/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と参考例2の1項（2）および（3）で得られたプラスミドp hKM1334HV0およびp hKM1334LV0を用いて抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1334HV0LV0を以下の様にして構築した。

##### 【0193】

参考例2の1項（2）で得られたプラスミドp hKM1334HV0の3μgを10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）及び10単位の制限酵素NotI（ニュー・イングランド・バイオラプス社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのApaI-NotI断片を約0.3μg回収した。

##### 【0194】

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3μgを10単位の制限酵素ApaI及び10単位の制限酵素NotIを用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのApaI-NotI断片を約2μg回収した。

次に、上記で得られた p h K M 1 3 3 4 H V 0 由来の N o t I - A p a I 断片 0. 1  $\mu$  g とプラスミド p K A N T E X 9 3 由来の N o t I - A p a I 断片 0. 1  $\mu$  g を全量 1 0  $\mu$  L の滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換し、図 1 4 に示したプラスミド p K A N T E X 1 3 3 4 H V 0 を得た。

## 【 0 1 9 5 】

次に、参考例 2 の 1 項 ( 3 ) で得られたプラスミド p h K M 1 3 3 4 L V 0 の 3  $\mu$  g を 1 0 単位の制限酵素 E c o R I （宝酒造社製）及び 1 0 単位の制限酵素 B s i W I （ニュー・イングランド・バイオラブズ社製）を用いて 3 7  $^{\circ}$  C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0. 4 4 k b の E c o R I - B s i W I 断片を約 0. 3  $\mu$  g 回収した。

## 【 0 1 9 6 】

次に、上記で得られたプラスミド p K A N T E X 1 3 3 4 H V 0 の 3  $\mu$  g を 1 0 単位の制限酵素 E c o R I 及び制限酵素 B s i W I を用いて 3 7  $^{\circ}$  C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 1 3. 2 0 k b の E c o R I - B s i W I 断片を約 2  $\mu$  g 回収した。

次に、上記で得られた p h K M 1 3 3 4 L V 0 由来の E c o R I - B s i W I 断片 0. 1  $\mu$  g とプラスミド p K A N T E X 1 3 3 4 H V 0 由来の E c o R I - B s i W I 断片 0. 1  $\mu$  g を全量 1 0  $\mu$  L の滅菌水に加え、ライゲーション・ハイ（東洋紡績社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換し、図 1 4 に示した発現ベクター p K A N T E X 1 3 3 4 H V 0 L V 0 を得た。

## 【 0 1 9 7 】

得られたプラスミドの 4 0 0 n g を用い、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン 2 （アプライド・バイオシステムズ社製）を用いてジデオキシ法による塩基配列の解析を行った結果、目的の DNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

また、F R のアミノ酸残基に改変を加えた V H および V L についても同様の方

法を用いて発現ベクターを作製した。

(5) 抗FGF-8中和CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

抗FGF-8中和CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現は、上記参考例1の2項(2)に記載の方法に従い、行った。

(6) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性の測定(ELISA)

抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性は、上記参考例1の2項(3)に記載のELISAにより測定した。

【0198】

【発明の効果】

本発明により、抗FGF-8中和抗体を有効成分として含有する、関節炎の予防薬または治療薬、軟骨保護剤、関節破壊抑制剤、滑膜増殖抑制剤、および抗FGF-8抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬ならびに該抗体を用いた関節炎の判定方法が提供される。

【0199】

「配列表フリーテキスト」

配列番号11-KM1334のVHの増幅用プライマー

配列番号12-KM1334のVHの増幅用プライマー

配列番号13-KM1334のVLの増幅用プライマー

配列番号14-KM1334のVHの増幅用プライマー

配列番号15-抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHとして設計されたアミノ酸配列、HV. 0

配列番号16-抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLとして設計されたアミノ酸配列、HL. 0

配列番号17-HV. 0をコードするDNAの造成用合成DNA

配列番号18-HV. 0をコードするDNAの造成用の合成DNA

配列番号19-HV. 0をコードするDNAの造成用合成DNA

配列番号20-HV. 0をコードするDNAの造成用合成DNA

配列番号21-HV. 0をコードするDNAの造成用合成DNA

配列番号 22-HV. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 23-Lys 12 を Ala に改変した HV. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 24-Val 68 を Ala に改変した HV. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 25-HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 26-HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 27-HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 28-HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 29-HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 30-HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 31-Tyr 93 を Phe に改変した HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

配列番号 32-Ile 2 を Val に改変した HL. 0 をコードする DNA の造成用合成 DNA

【0200】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Diagnostic agent and therapeutic agent for arthritis

<130> H13-2344S3

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<400> 1

atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly

1

5

10

15

gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg 96

Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg

20

25

30

ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt 192

Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu

50

55

60

gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat 240

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn

65

70

75

80



gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85

90

95

aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100

105

110

tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val

115

120

125

tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca 420  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr

130

135

140

【 0 2 0 1 】

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly

1

5

10

15

Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn

65

70

75

80

Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100

105

110

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val

115

120

125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr

130

135

140

【 0 2 0 2 】

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(393)

&lt;400&gt; 3

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1

5

10

15

tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

20

25

30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt 144

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35

40

45

gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct 192

Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50

55

60

ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tct 240

Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser

65

70

75

80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85

90

95

ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

100

105

110

ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 384

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115

120

125

gaa ata aaa

393

Glu Ile Lys

130

【0203】

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1

5

10

15

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

20

25

30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35

40

45

Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50

55

60

Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser

65

70

75

80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85

90

95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

100

105

110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115

120

125

Glu Ile Lys

130

【0204】

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Tyr Tyr Leu Asn

1

5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu Glu

1

5

10

15

Gly

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr

1

5

10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 8

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 9

Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser

1

5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1

5

【0205】

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for amplification of VH of KM1334

<400> 11

ctgaattcgc ggccgctagt cc

22

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for amplification of VH of KM1334

<400> 12

atgggccctt ggtggaggct gtagagacag tgaccagag

39

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for amplification of VL of KM1334



&lt;400&gt; 13

ctgaattcgc ggccgctgct gt

22

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a primer for amplification of VL of KM1334

&lt;400&gt; 14

atcgtagctt ttatttccag ctggtcc

28

【 0 2 0 6 】

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> HV.0, a designed amino acid sequence of VH of an anti-FGF-8 CDR-gr  
afted neutralizing antibody

&lt;400&gt; 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu

50

55

60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

[0207]

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> HL.0, a designed amino acid sequence of VL of an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

&lt;400&gt; 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1                      5                      10                      15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20                      25                      30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35                      40                      45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro

50                      55                      60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65                      70                      75                      80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85                      90                      95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100                      105                      110

【0208】

&lt;210&gt; 17

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 17

gttttcccag tcacgacgcg gccgcaccat ggaatggatc tggatctttc tcttcttct 60

ctcaggaact acaggtgtct actcccaggt

90

<210> 18

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 18

aaggtgtatc cagatgcctt gcaggaaacc ttcactgagg ccccaggctt cttcacctca 60

gccccagact gcaccagctg cacctgggag tagacacct

99

<210> 19

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 19

ggcatctgga tacaccttca ccgactacta tctaaactgg gtgcgacagg cccctggaca 60

agggcttgag tggatgggag agattgatcc tggaagtga

99

<210> 20

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 20

agctccatgt aggctgtgct cgtggacgtg tccgcggtaa tggatgactct gccctccaag 60

ttttcattat aatatatact atcacttcca ggatcaatc

99

[0209]

<210> 21

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 21

cacagcctac atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc 60

gagatatggg tattctagat acgacgtaag gtttgtcta

99

<210> 22

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 22

caggaaacag ctatgacaag cttgggccct tgggtggaggc tgaggagacg gtgaccaggg 60

ttccctggcc ccagtagaca aaccttacgt cg

92

<210> 23

<211> 99

<212> DNA

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0 in which L  
ys12 was mutated to Ala

&lt;400&gt; 23

aaggtgtatc cagatgcctt gcaggaaacc ttactgagg cccaggctt cgccacctca 60

gccccagact gcaccagctg cacctgggag tagacacct

99

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0 in which V  
al68 was mutated to Ala

&lt;400&gt; 24

tgtccgcggt aatggtggct

20

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0

<400> 25

gttttcccag tcacgacgaa ttcacatgaa gttgcctggt aggctgttgg tgctgatgtt 60

ctggattcct gcttccagat ccga

84

[0210]

<210> 26

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0

<400> 26

ctagatctgc aggagatgga ggccggctct ccaggggtga cgggcaggga gaggggagac 60

tgagtcatca caatatcgga tctggaagca gga

93

<210> 27

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0

<400> 27

catctcctgc agatctagtc agagtcttgt acatagtaat ggaagaacct atttagaatg 60

gtacctgcag aagccagggc agtctccaca gct

93

<210> 28

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0

<400> 28

aaatctgtgc ctgatccact gccactgaac ctgtcaggga cccagaaat tcggttgga 60

actttataga tcaggagctg tggagactgc cct

93

<210> 29

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0

<400> 29

tgatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagagtg gaggtgagg atgttgggt 60

ttattactgc ttccagggtt cacatgttcc gta

93

<210> 30

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0

<400> 30

caggaaacag ctatgacaag cttcgtacgt ttgattcca ccttggtccc ttggccgaac 60

gtgtacggaa catgtgaacc c

81

[0211]

<210> 31

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0 in which Tyr93 was mutated to Phe

&lt;400&gt; 31

tggatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg atgttggggt 60

ttatttctgc tttcagggtt cacatgttcc gta

93

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HL.0 in which Ile2 was mutated to Val

&lt;400&gt; 32

gagactgagt catcacaaca tc

22

【0212】

【図面の簡単な説明】

【図1】

ウサギ軟骨細胞のFGF-8による細胞外マトリックスの分解作用を示す図である。縦軸は細胞外マトリックス中に残ったグリコサミノグリカンの量を、横軸はFGF-8の濃度 (ng/mL) を示している。値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、\*\*\*は $P < 0.001$  (無刺激群対比、Dunnett検定) を表す。

## 【図2】

ウサギ軟骨細胞のFGF-8による細胞外マトリックスの分解に対する抗体の阻害作用を示す図である。縦軸は細胞外マトリックス中に残ったグリコサミノグリカンの量を、横軸はKM1334の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示している。値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、###は $P<0.001$  (無刺激群対比、Studentのt-検定) を表し、\*\*は $P<0.01$ 、\*\*\*は $P<0.001$  (FGF-8 100 ng/mL添加群対比、Dunnett検定) を表す。

## 【図3】

ウサギ滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進作用を示す図である。縦軸はウサギ滑膜細胞に取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] チミジンの放射活性を、横軸はFGF-8の濃度 ( $\text{ng}/\text{mL}$ ) を示している。値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、\*は $P<0.05$  (無刺激群対比、Steel検定) を表す。

## 【図4】

ウサギ滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進に対する抗体の阻害作用を示す図である。縦軸はウサギ滑膜細胞に取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] チミジンの放射活性を、横軸はKM1334の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示している。値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、###は $P<0.001$  (無刺激群対比、Studentのt-検定) を表し、\*\*\*は $P<0.001$  (FGF-8 100 ng/mL添加群対比、Dunnett検定) を表す。

## 【図5】

ヒト滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進作用を示す図である。縦軸はヒト滑膜細胞に取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] チミジンの放射活性を、横軸はFGF-8の濃度 ( $\text{ng}/\text{mL}$ ) を示している。値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、\*\*\*は $P<0.001$  (無刺激群対比、Dunnett検定) を表す。

## 【図6】

ヒト滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進に対する抗体の阻害作用を示す図である。縦軸はヒト滑膜細胞に取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] チミジンの放射活性を、横軸はKM1334の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示している。値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、###は $P<0.001$  (無刺激群対比、Aspin-Welch検定)

を表し、\*は $P < 0.05$  (FGF-8 500 ng/mL添加群対比、Steel検定)を表す。

【図7】はプラスミドpKANTEX1334HおよびプラスミドpKANTE X1334の造成工程を示した図である。

【図8】はプラスミドphKM1334HV0の造成工程を示した図である。

【図9】はプラスミドphKM1334HV12の造成工程を示した図である。

\*は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

【図10】はプラスミドphKM1334HV68の造成工程を示した図である。  
\*は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

【図11】はプラスミドphKM1334LV0の造成工程を示した図である。

【図12】はプラスミドphKM1334LV92の造成工程を示した図である。  
\*は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

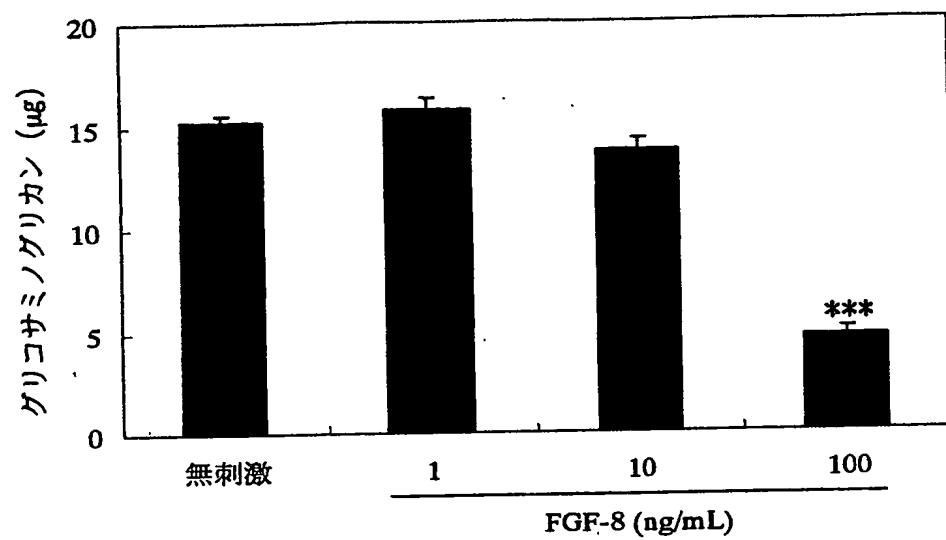
【図13】はプラスミドphKM1334LV2の造成工程を示した図である。

\*は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

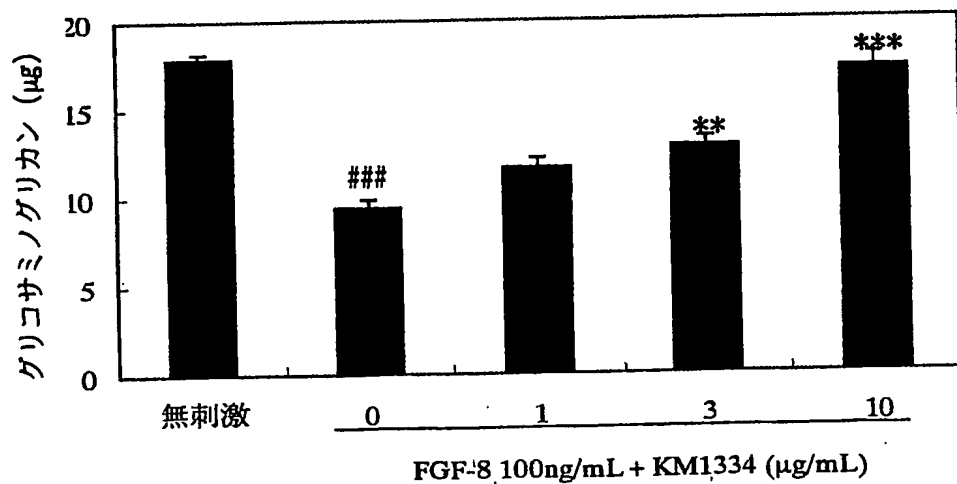
【図14】はプラスミドpKANTEX1334HV0およびプラスミドpKANTEX1334HV0LV0の造成工程を示した図である。

【書類名】 図面

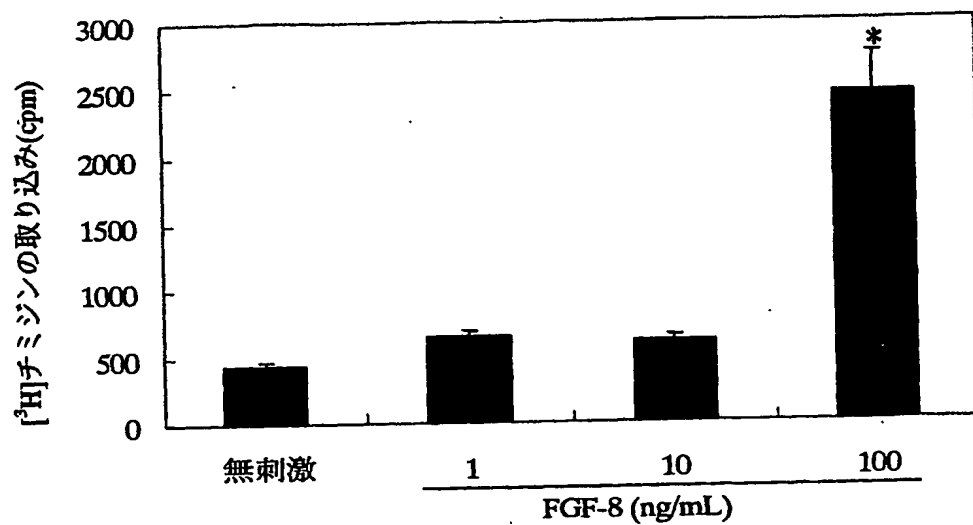
【図 1】



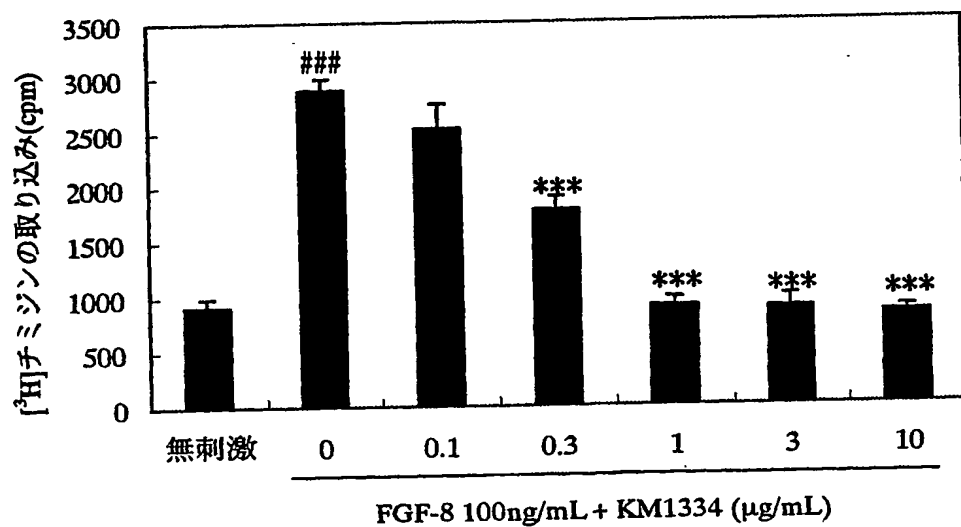
【図 2】



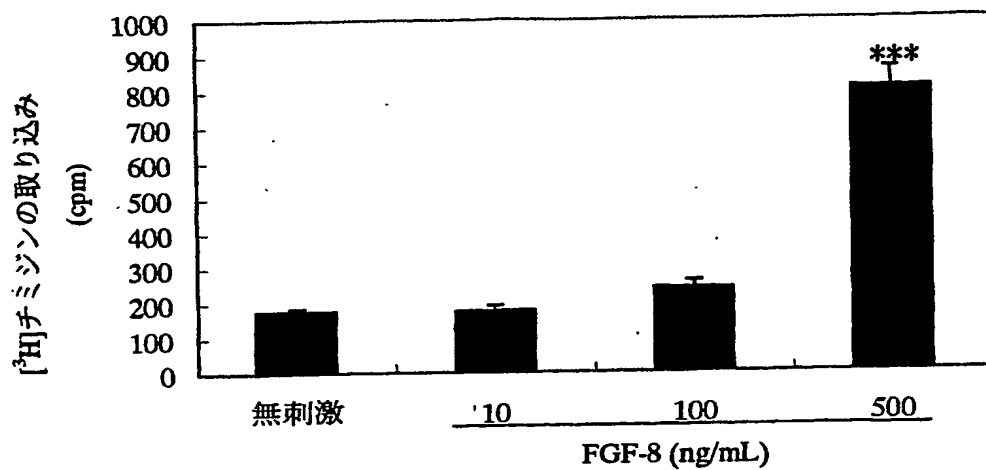
【図 3】



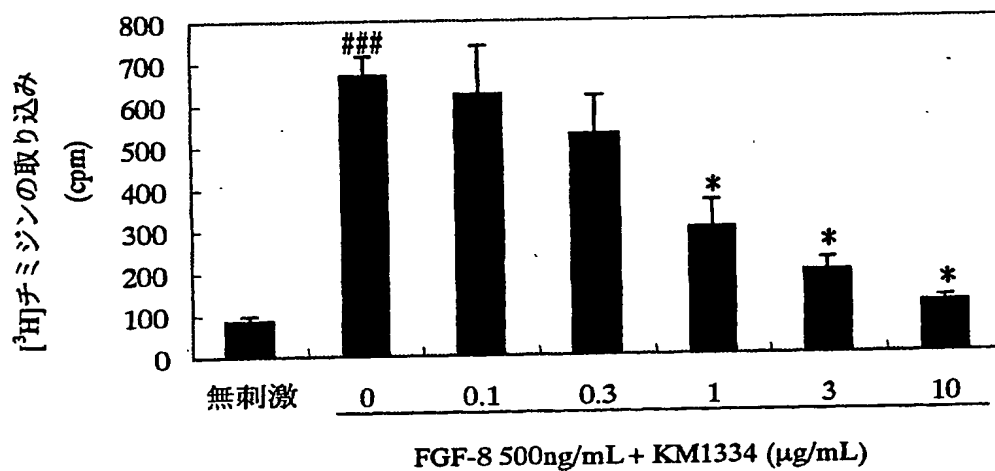
【図 4】



【図 5】

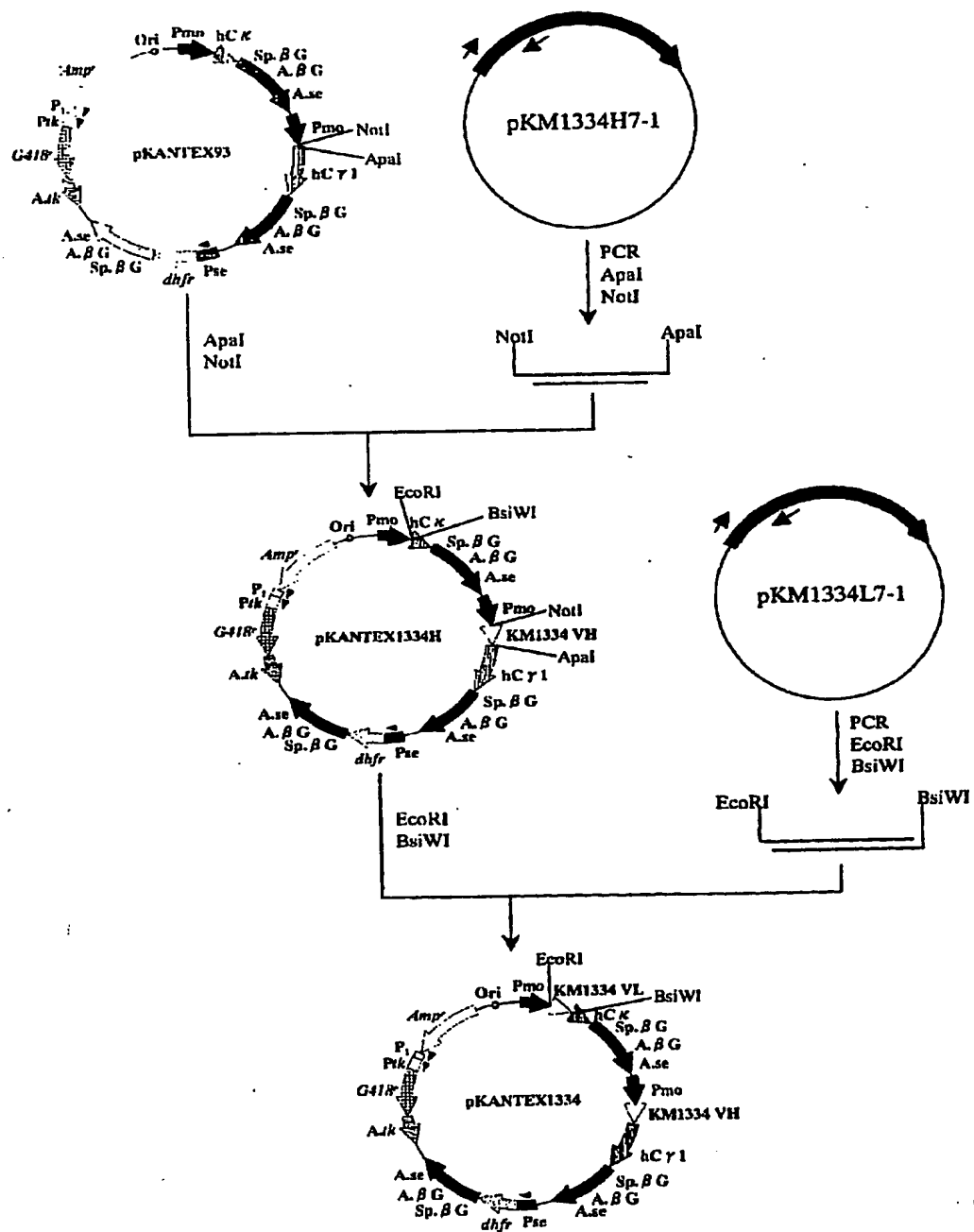


【図 6】

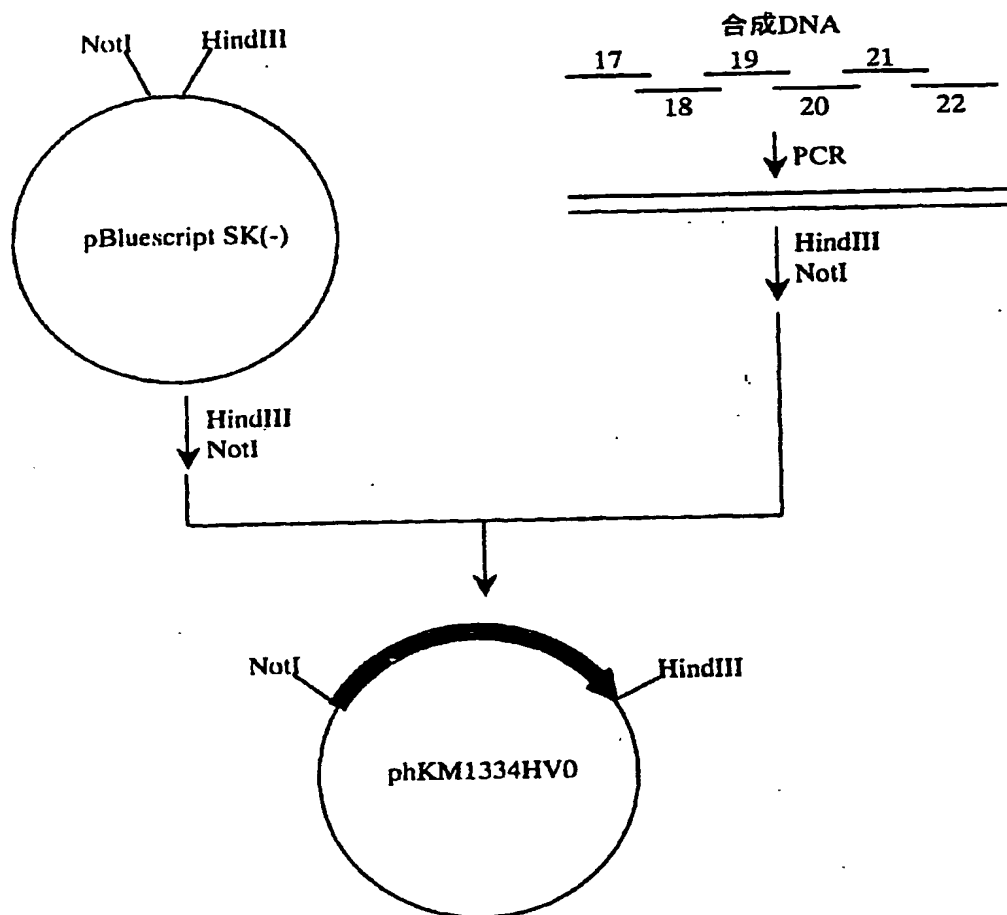




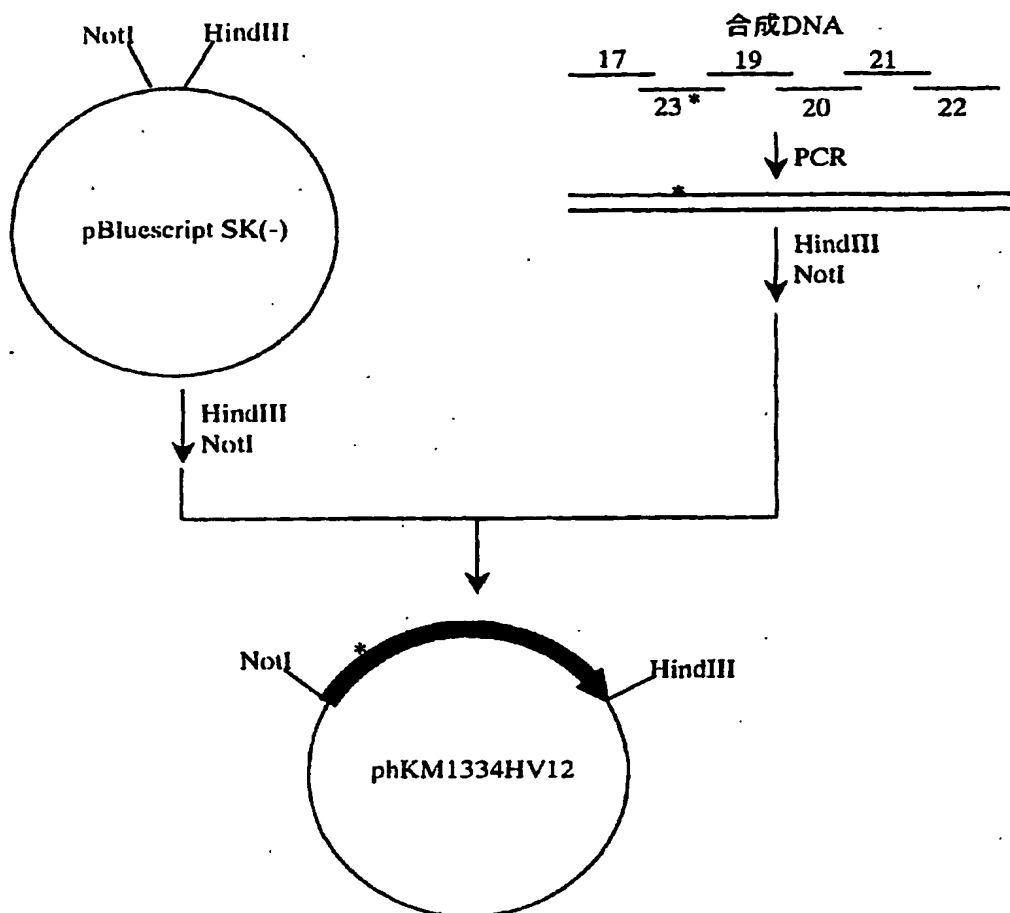
【図 7】



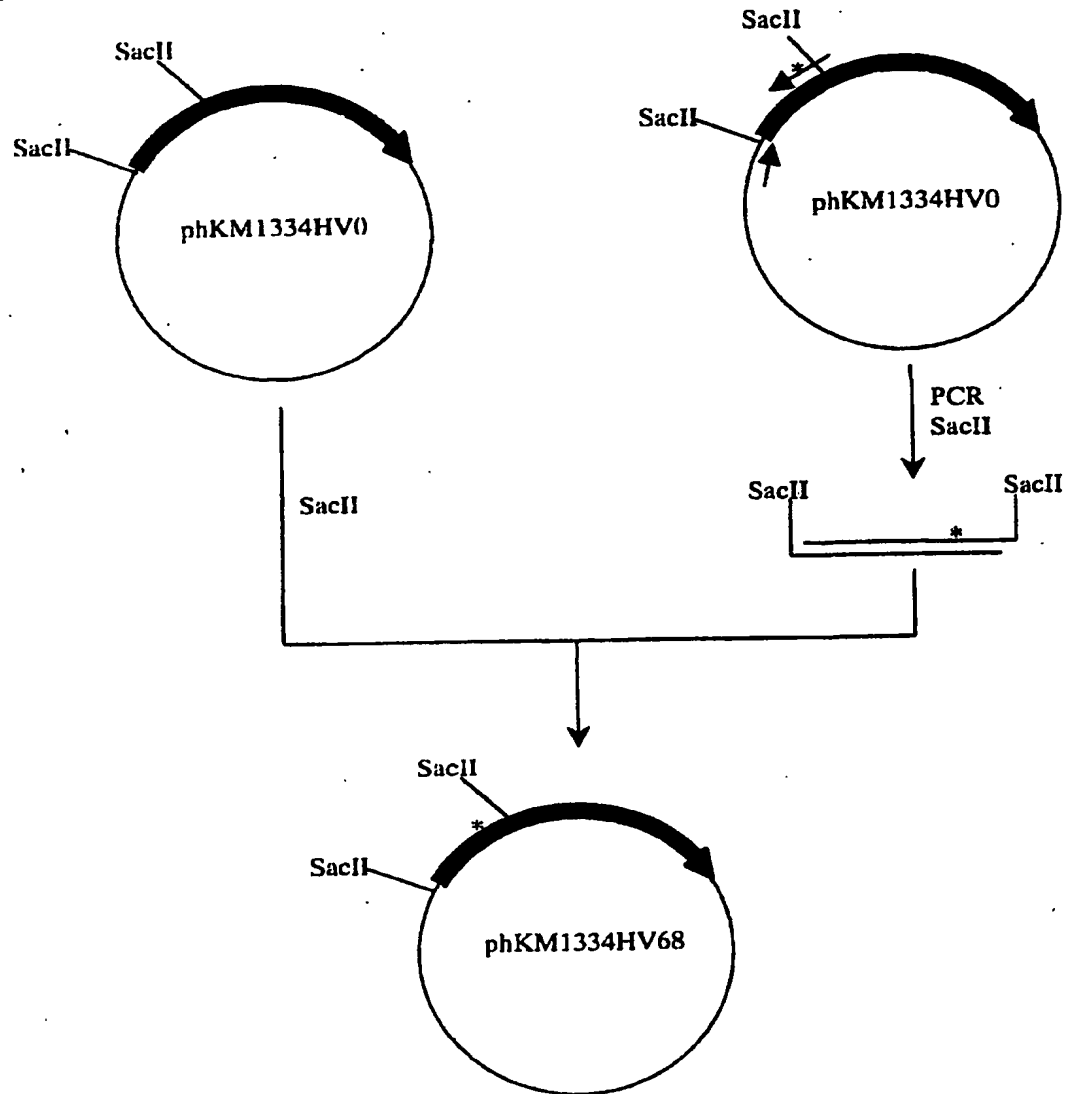
【図8】



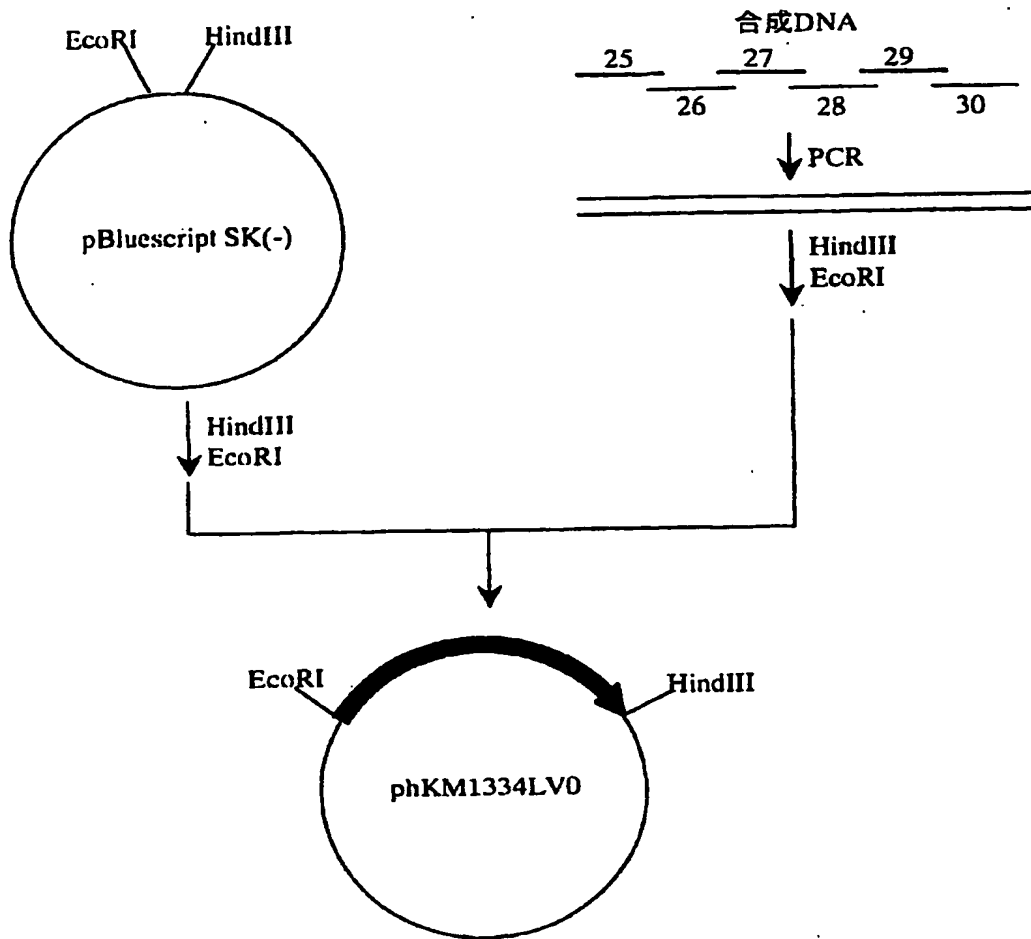
【図9】



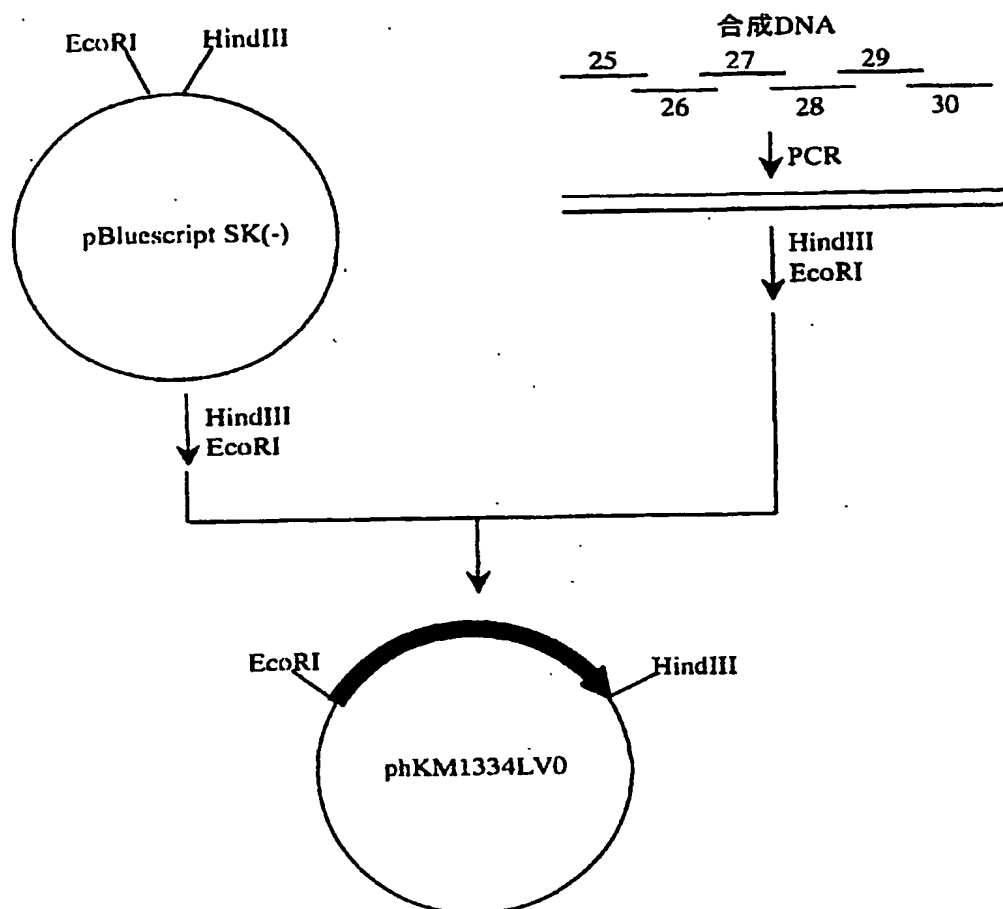
【図10】



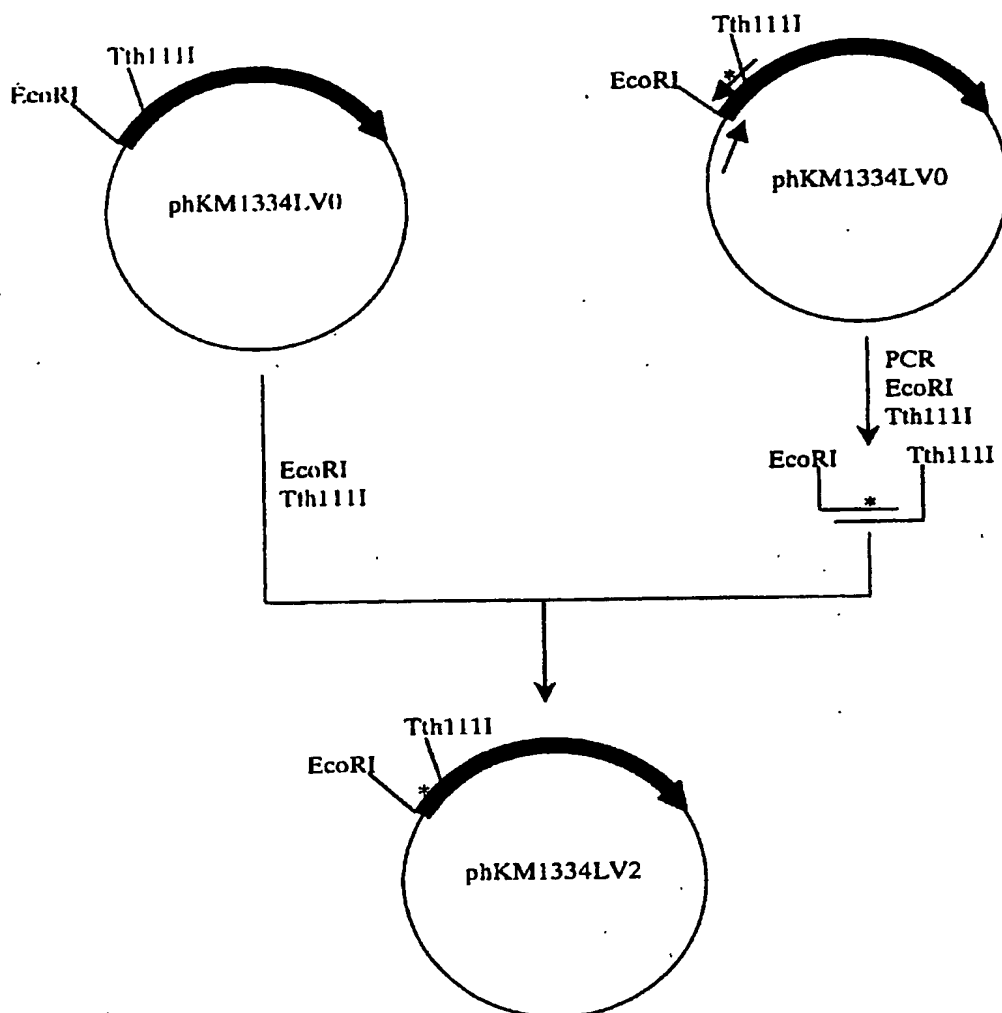
【図 11】



【図12】



【図13】







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 関節炎の予防薬または治療薬、軟骨保護剤、関節破壊抑制剤、滑膜増殖抑制剤、および関節炎の診断薬ならびに関節炎の判定方法を提供する。

【解決手段】 本発明により、抗FGF-8中和抗体を有効成分として含有する、関節炎の予防薬または治療薬、軟骨保護剤、関節破壊抑制剤、滑膜増殖抑制剤、および抗FGF-8抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬、ならびに抗FGF-8抗体を用いることを特徴とする関節炎の判定方法が提供される。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日

1990年 8月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名

協和醗酵工業株式会社